

Cinthia Rejane Corrêa

**EFEITO DA RESTRIÇÃO CALÓRICA SOBRE PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS EM RATOS WISTAR MACHOS**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Nutrição da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Mestre em Nutrição.

Orientador: Profa. Dra. Júlia Dubois  
Moreira

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do  
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Corrêa, Cinthia Rejane

Efeito da restrição calórica sobre parâmetros  
comportamentais em ratos Wistar machos / Cinthia Rejane  
Corrêa ; orientadora, Júlia Dubois Moreira - Florianópolis,  
SC, 2016.

109 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Nutrição.

Inclui referências

1. Nutrição. 2. Restrição calórica. 3. Comportamento. 4.  
Ansiedade. I. Moreira, Júlia Dubois. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Nutrição. III. Título.

Cynthia Rejane Corrêa

FOLHA DE ASSINATURA



Este trabalho é dedicado àqueles que me apoiaram, de perto ou de longe, especialmente, à minha família.



## AGRADECIMENTOS

Agradecer depois desses dois anos é uma das primeiras coisas que precisa ser escrita nesse trabalho. Seja pelo auxílio na execução e andamento do projeto, sejam pelas conversas, cafés, ligações, companhia e força pra me fazer continuar.

Primeiramente, eu agradeço à minha família, pai, mãe e meu irmão. Essencialidade define o apoio de vocês nessa fase, aturando meus desesperos, me fazendo companhia nos finais de semana, cuidando de mim durante a caxumba agora no final, me ouvindo e orientando pelo Skype. Enfim, obrigada! Dedico à minha querida vó Ride, que lá de cima tem me dado força e boas vibrações.

A segunda família, aquela que a gente escolhe, eu também agradeço. Às UFSCats, turma pequena mas incrível do mestrado: Clarice, Jéssica, Tailane, Julia, Tati. À Ivana e Angela, gratidão pela amizade e parceria de RU, BU, cafezinhos, festas e ralação no projeto, vocês foram essenciais! Amigos curitibanos também, sempre mandando força e/ou me visitando: Nadia, Kayro, Kenneth, Ana, Bruno, Jeh, Aline, Dani, Helena, Vih, Liz (agora minha companheira também no mestrado) e todo mundo! E a Rebekka, minha irmã de coração, obrigada pelo apoio, amizade e cumplicidade.

À equipe do laboratório de Nutrição Experimental, agradeço pelo comprometimento, parceria e risadas mesmo durante o trabalho duro: Ana Paula, Delma, Andreza, Greice, Sofia, Priscila e Claudinha, sem vocês eu teria enlouquecido. Agradeço também a professora Jussara e o técnico do laboratório, Gerson.

Professora Júlia, muito obrigada pela orientação, palavras para me acalmar, pelos conselhos e conversas. Professora Letícia, também te agradeço muito, pela co-orientação e acompanhamento nas aulas do estágio em Docência. Vocês duas foram essenciais para meu processo de evolução e crescimento!

As parcerias também devem ser lembradas e agradecidas, por isso, agradeço ao professor Edson e suas alunas Taís e Marina, professor Marcelo Farina e à professora Débora. Agradecimento especial ao pessoal da Farmacologia, pela execução dos testes comportamentais: professor Rui Prediger e seus alunos Samantha e Filipe. Agradeço também à professora Morgana, por sempre estar disponível para sanar-me as dúvidas.

Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do nosso projeto, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

(CAPES) pela bolsa de estudos durante os dois anos de mestrado e ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição.



Seja qual for o final  
Faça ser algo ideal  
Seja qual for o final  
Faça ser algo surreal.

(Surreal - Scalene)



## RESUMO

Estudos experimentais animais sobre a restrição calórica (RC) sem desnutrição, aplicados durante a fase adulta, têm sugerido ações salutares em vários desfechos analisados. Dentre elas, efeitos benéficos a nível cerebral, ligados ao comportamento, como a memória e a atividade locomotora. Por isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de um protocolo de RC progressiva nos parâmetros comportamentais relativos à atividade locomotora, ao comportamento tipo ansioso e à memória dos animais, bem como seus efeitos no estado nutricional. Ratos Wistar, machos, com idade inicial de 60 dias foram divididos aleatoriamente em dois grupos: o grupo controle (n=9) que recebeu a ração desenvolvida de acordo com a AIN-93M, com consumo *ad libitum*, e o grupo que teve RC progressiva de 30% (n=9) em relação a média de consumo semanal do grupo controle. A intervenção teve duração de 12 semanas nas quais foi analisado o ganho ponderal semanal de peso e os testes comportamentais (campo aberto, reconhecimento de objetos, labirinto em cruz elevado e labirinto aquático de Morris) foram realizados na 12<sup>a</sup> semana de intervenção. As análises referentes ao estado nutricional foram realizadas por meio da análise bioquímica sérica (albumina, creatinina, ureia, AST, ALT, glicose, colesterol, triglicerídeos e proteína total), ao final do experimento. Ao longo das 12 semanas de intervenção dietética, o grupo RC apresentou ganho de peso corporal 21% inferior em relação ao grupo controle. Referente à análise comportamental, não foi observada diferenças estatisticamente significativas entre ambos os grupos na atividade locomotora, ao comportamento tipo ansioso e memória. A RC não causou desnutrição de acordo com as variáveis bioquímicas séricas analisadas. Houve redução significativa dos triglicerídeos ( $p=0,013$ ) e da ureia ( $p=0,006$ ), além do incremento da creatinina ( $p=0,03$ ) em relação ao grupo controle. Esses achados sugerem que este protocolo de RC, com a suplementação adequada de micronutrientes, reduz o peso corporal ao final da intervenção, sem causar desnutrição e prejuízos tanto comportamentais quanto motor nos animais, sugerindo possíveis efeitos regulatórios e compensatórios positivo perante a redução do consumo alimentar.

**Palavras-chave:** Ansiedade. Atividade locomotora. Comportamento. Memória. Restrição calórica.



## ABSTRACT

The experimental caloric restriction (CR) studies, without malnutrition and applied during the adulthood, suggests salutary actions on multiple outcomes analyzed. Among them, beneficial effects in the brain linked to behavior, such as memory and locomotor activity. Therefore, the present study assessed the effects of a progressive CR protocol on behavioral parameters related with locomotor activity, anxiety-like behavior, memory function and their effects on nutritional status. Sixty days old Wistar male rats were randomly divided in two groups: control group (n=9) were feed *ad libitum* consumption with chow developed according to AIN-93M, and the group which 30% progressive CR (n=9) in relation to average weekly consumption of the control group. The intervention lasted 12 weeks and was analyzed weekly weight gain and performed behavioral tests (open field, object recognition, elevated plus maze and Morris water maze), realized it 12 week intervention. The nutritional status analyses were used serum biochemical analysis (albumin, creatinine, urea, hepatic enzymes, cholesterol, triglycerides and total protein), at the end of 12 weeks dietary intervention. Along the 12 weeks intervention, the body weight gain on CR group was 21% lower than the control group. Concerning the behavioral analysis, there was no statistically significant differences between groups in locomotor activity, anxiety-like behavior and memory. The CR did not cause malnutrition according to serum biochemical variables. There were significant reduction in triglycerides (p=0.013) and urea (p=0.006), and the increase in creatinine (p=0.03) compared to the control group. These findings suggest that our CR protocol, with appropriate micronutrient supplementation, reduces body weight without causing malnutrition and behavioral and motor impairments in animals, suggesting possible positive regulatory and compensatory effects towards the reduction of food consumption.

**Keywords:** Anxiety-like behavior. Behavior. Caloric restriction. Calorie restriction. Locomotor activity. Memory function.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ações benéficas da RC baseadas na literatura.....	35
Figura 2: Fluxograma do estudo.....	47
Figura 3: Linha temporal do estudo .....	48
Figura 4: Esquematização da progressão da RC no decorrer do experimento .....	49
Figura 5: Unidade do CA utilizada com representação esquemática da zona central e zona periférica.....	53
Figura 8: Teste do RO - À esquerda: fase de amostra. À direita: fase de discriminação .....	55
Figura 6: Aparato utilizado no teste do LCE .....	57
Figura 7: Aparato do LAM e a representação esquemática dos quadrantes e plataforma.....	59





## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1: Composição da mistura de minerais contida na ração.....	51
Quadro 2: Composição da mistura vitamínica contida na ração .....	52
Quadro 3: Variáveis etológicas observadas no teste do CA .....	54
Quadro 4: Medidas etológicas avaliadas no teste do RO.....	56
Quadro 5: Variáveis etológicas observadas no LCE.....	57
Quadro 6: Principais variáveis etológicas avaliadas no LAM .....	59



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT – Alanina aminotransferase  
AST – Aspartato transaminase  
BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro  
CA- Campo aberto  
cAMP – Adenosina monofosfato cíclico  
CNTF – Fator neurotrófico ciliar  
COX2 – Ciclo-oxigenase 2  
CREB – Elemento de ligação sensível ao cAMP (*cAMP responsive-element binding*)  
DCNT – Doenças crônicas não transmissíveis  
DeCS – Descritores em Ciências da Saúde  
EROs – Espécies reativas de oxigênio  
FoxO – *forkhead box*  
GDNF – Fator neurotrófico derivado da glia  
IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina  
LAM – Labirinto aquático de Morris  
LCE – Labirinto em cruz elevado  
LTP – potenciação de longa duração (*long-term potentiation*)  
MeSH – *Medical Subject Heading*  
mTOR – Alvo mamífero de rapamicina  
NGF – Fator de crescimento neural  
NT-3 – Neurotrofina 3  
NT-4 – Neurotrofina 4  
PKA – Proteína cinase A  
RC – Restrição calórica  
RO – Reconhecimento de objeto  
SIRT – Sirtuínas  
TAB – Tecido adiposo branco  
TLEY – Teste do labirinto elevado em Y  
TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$   
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular  
WNPRC – Centro Nacional de pesquisas com primatas de Wisconsin



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
1.1 OBJETIVOS .....	28
1.1.1 Objetivo Geral.....	28
1.1.2 Objetivos Específicos.....	28
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>29</b>
2.1 RESTRIÇÃO CALÓRICA .....	31
2.1.1 Restrição calórica: visão geral.....	31
2.1.2 RC e seus papéis na função cerebral .....	37
2.1.3 Implicações terapêuticas da RC sobre os parâmetros comportamentais.....	40
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO .....	45
3.2 PROCEDIMENTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	45
3.3 ENSAIO BIOLÓGICO .....	45
3.4 DESENVOLVIMENTO DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA .....	48
3.4.1 Mensuração da média do consumo alimentar semanal do grupo controle.....	48
3.4.2 Formulação das dietas .....	49
3.5 ANÁLISE COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS .....	52
3.5.1 Teste de campo aberto: Atividade locomotora.....	53
3.5.2 Teste do reconhecimento de objeto: Memória de curto prazo	54
3.5.3 Teste do labirinto em cruz elevado: Comportamento tipo ansioso.....	56
3.5.3 Labirinto aquático de Morris: Memória espacial.....	58
3.6 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE .....	60
3.7 PESO E MARCADORES DO ESTADO NUTRICIONAL .....	60
3.7.1 Avaliação ponderal do peso e estruturas corporais .....	60

<b>3.7.2 Marcadores bioquímicos .....</b>	<b>60</b>
3.7.2.1 Análise do soro.....	60
3.7.2.2 Dosagem de proteínas totais .....	60
3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS .....	61
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>63</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>94</b>
<b>APÊNDICE A – Matriz de síntese com estudos sobre RC e comportamento.....</b>	<b>103</b>
<b>APÊNDICE B: Modelo de planilha para cálculo da média do consumo alimentar semanal do grupo controle .....</b>	<b>105</b>
<b>APÊNDICE C: Nota de imprensa.....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXO A – Parecer de aprovação do CEUA/UFSC .....</b>	<b>109</b>







## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos têm ocorrido mudanças no padrão alimentar mundial. Dentre os padrões alimentares atuais, é destacada a dieta ocidental, caracterizada pela elevada ingestão de alimentos processados e ultraprocessados, identificados pela alta densidade energética e teor de gorduras totais, gorduras saturadas, açúcar e sal. Os principais constituintes da dieta ocidental são as carnes vermelhas e processadas, as sobremesas açucaradas, os alimentos ricos em gordura e os grãos refinados, os produtos lácteos com alto teor de gordura e as bebidas ricas em açúcar (CANELLA et al., 2014; HALTON et al., 2006).

A difusão da dieta ocidental tem contribuído para o desenvolvimento de disfunções metabólicas e doenças associadas, entre elas a epidemia mundial de obesidade, doenças metabólicas como resistência à insulina, diabetes tipo 2, dislipidemia, doenças cardiovasculares, hipertensão, esteatose hepática não alcoólica, aumento da incidência de doença renal crônica e câncer. Além de colaborar para o desenvolvimento de doenças autoimunes, de osteoporose, do processo inflamatório crônico e de doenças neurodegenerativas (OKRĘGLICKA, 2015; QI et al., 2009).

O elevado consumo de gorduras saturadas, ácidos graxos ômega-6 (AG n-6) e carboidratos refinados contribuem para vários fatores prejudiciais à função cerebral e cognitiva, observados tanto em animais quanto em humanos. Estudos em humanos têm sugerido associação entre o consumo elevado de gorduras saturadas e prejuízo na função cognitiva. Somado a isso, estudos em animais, com elevado consumo desse tipo de gordura, demonstraram redução dos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF- *brain-derived neurotrophic factor*) hipocampal e aumento do estresse oxidativo, que podem contribuir para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e neuroinflamação (FRANCIS; STEVENSON, 2013; FAROOQUI, 2012).

Paralelamente ao padrão alimentar ocidental, alguns padrões alimentares têm surgido com o intuito de promover a saúde por meio do consumo de alimentos saudáveis. Uma das práticas alimentares que se difundiu mundialmente é dieta mediterrânea, influente desde meados dos anos 60, que está inversamente associada com a mortalidade e incidência de muitas doenças, entre elas: doença coronariana, acidente vascular cerebral trombotico, câncer em geral e diabetes *mellitus* na idade adulta. Estudos clínicos demonstraram

associação positiva entre a dieta mediterrânea e a melhora da função cognitiva em idosos (TRICHOPOULOU et al., 2014; VALLS-PEDRET et al., 2015; WENGREEN et al., 2013).

A cognição refere-se aos processos mentais nos quais são envolvidas a aquisição de conhecimentos e a integração desses processos em respostas como aprendizagem, atenção, memória, inteligência e consciência. A disponibilidade de alguns nutrientes pode ter efeito imediato no comportamento em geral, especialmente na habilidade de resposta aos estímulos. É sugerido que o funcionamento cerebral, incluindo o processo cognitivo, responde a alterações nutricionais, seja pela privação, seja pelo excesso alimentar. A nutrição afeta a química cerebral e seu papel na neurociência é multifatorial, ou seja, vários nutrientes podem atuar em um determinado fator cognitivo. (BEVINS; BESHEER, 2006; DAUNCEY, 2009; MURPHY et al., 2014).

Neste contexto, as intervenções dietéticas agem como fatores e indutores ambientais eficazes, desempenhando importante papel na modulação das funções cerebrais e atuam de forma preventiva no retardo de alterações cognitivas e demência (MURPHY et al., 2014). A função cognitiva pode ser preservada, melhorada ou retardada seu declínio por diversos fatores, dentre eles a vitamina D, os ácidos graxos ômega-3, a curcumina e os flavonoides (BRYAN; CALVARESI; HUGHES, 2002; FRAUTSCHY et al., 2001; PRZYBELSKI; BINKLEY, 2007; VAN GELDER et al., 2007).

Evidências dos efeitos combinados, tais como abordagens multinutricionais ou um padrão alimentar saudável, como a dieta mediterrânea, estão crescendo. Ao longo dos últimos anos, os padrões dietéticos têm sido cada vez mais investigados para a melhor compreensão da relação entre dieta e o declínio cognitivo e demência (VAN DE REST et al., 2015).

A dieta tem efeito relevante sobre a saúde mental, tanto no desenvolvimento do organismo quanto no envelhecimento, podendo influenciar as capacidades de aprendizagem, de memória e de humor. Os fatores dietéticos podem atuar nos processos cerebrais por meio da regulação das vias de neurotransmissores, da transmissão sináptica, da fluidez de membrana e das vias de transdução de sinal.

Além disso, os nutrientes e a dieta num contexto amplo podem interferir diretamente nas funções cerebrais e nas regiões ligadas ao processo cognitivo, entre eles o processo de função neuronal,

plasticidade sináptica\* e neurogênese adulta\* (GÓMEZ-PINILLA, 2008; YON; MAUGER; PICKAVANCE, 2013; WARBURTON; BROWN, 2015; PANI, 2015).

Ao encontro das práticas alimentares que promovam a saúde e bem-estar físico e mental, a restrição calórica (RC) é sugerida como uma prática benéfica ao organismo. É considerada a melhor forma de regime dietético voltado ao aumento da expectativa de vida, quando comparado aos regimes de restrições de macronutrientes específicos, como a restrição proteica. Além do aumento da expectativa de vida, a RC melhorou os desfechos comportamentais em alguns modelos animais de desordens neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e doença de Huntington (GOULD et al., 1995; MATTSON et al., 2004). Estudos em animais sugerem que a porcentagem e tempo de início da RC, horário de oferta da ração e a composição da dieta desempenham importante papel na promoção da saúde e longevidade, quebrando o velho dogma de que só a ingestão de calorias é importante no prolongamento da vida de forma saudável (RIZZA; VERONESE; FONTANA, 2014).

Hipóteses que ligam a RC com a capacidade cognitiva incluem aumento da sensibilidade à insulina, mecanismos antiinflamatórios, redução do estresse oxidativo neural, promoção da plasticidade sináptica, indução de vários fatores neurotróficos e neuroprotetores, dentre eles, as sirtuínas e o BDNF. (GILLETTE-GUYONNET; SECHER; VELLAS, 2013). O modelo de RC no início da fase adulta foi escolhido baseado na hipótese de que qualquer intervenção potencial sobre o envelhecimento em estudos clínicos seria iniciada em populações adultas. O início durante esta fase possibilitaria a avaliação dos efeitos durante a fase idosa (COLMAN et al., 2014).

Mattson defende que a sociedade atual precisa agir contra as doenças e outros fatores relacionados à alimentação e ao sedentarismo, por isso, destaca a necessidade da ação preventiva por meio de práticas

---

\* A plasticidade sináptica refere-se às respostas adaptativas do sistema nervoso aos estímulos percebidos, é fundamental para os mecanismos celulares de memória de longa duração e de aprendizagem (PANI, 2015; DIAS; REIS, 2009; KANDEL et al, 2014).

\* Geração de novos neurônios e sua incorporação nas redes neurais pré-existentes (PANI, 2015).

alimentares, como a RC, a fim de evitar ou retardar o tratamento farmacológico (MATTSON, 2015).

Os estudos em modelos animais são essenciais para a compreensão do impacto do consumo energético da dieta sobre o cérebro, a nível celular e molecular. Além disso, os dados oriundos dos estudos experimentais animais direcionam futuros projetos clínicos. Os ratos são os mamíferos mais utilizados para testar essas hipóteses e seus subseqüentes processos para, posteriormente, levar aos ensaios clínicos (FONTANA; PARTRIDGE; LONGO, 2010).

Apesar de estudos demonstrarem benefícios da RC relacionados ao comportamento, assim como, agir beneficemente em modelos animais de neurodegeneração, ainda não há consenso sobre a temática. Embora haja extensa literatura científica sobre o contexto, não há padronização e descrição metodológica detalhada referente ao protocolo dietético aplicado. Em conjunto, esses fatores corroboram para a dificuldade de comparação e reprodutibilidade dos estudos, por isso, o projeto apresenta a seguinte pergunta de partida:

*Quais os efeitos da restrição calórica sobre os parâmetros comportamentais em ratos Wistar machos?*

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da restrição calórica sobre parâmetros comportamentais em ratos Wistar machos.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Implementar protocolo dietético de restrição calórica;
- Avaliar os parâmetros comportamentais (atividade exploratória, comportamento tipo ansioso, e memória de curto prazo e memória espacial) dos animais adultos submetidos ao protocolo dietético;
- Realizar avaliação bioquímica sérica (albumina, creatinina, ureia, AST, ALT, glicose, colesterol, triglicerídeos e proteína total) após aplicação do protocolo dietético;
- Avaliar o crescimento dos animais por meio da evolução ponderal semanal.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Para a revisão da literatura foram utilizados os unitermos disponíveis no Medical Subject Heading (MeSH) e no Descritores em Ciências da Saúde (DeCS). Com a finalidade de aperfeiçoar a busca pelos artigos, foram acrescentados termos adicionais àqueles encontrados em ambos os descritores. A tabela 01 apresenta os unitermos utilizados na busca.

Devido à atualidade do tema do projeto e a carência de artigos considerados elegíveis em português, a busca de artigos foi realizada apenas com o idioma de publicação em inglês. A busca foi realizada nas bases de dado PubMed, Web of Science, Science Direct, e Scielo e atualizada em abril de 2016. Além dos artigos obtidos pela busca sistemática, foi feita a busca ativa dos artigos.

**Tabela 1:** Unitermos utilizados para a busca literária referente às duas exposições e seus respectivos desfechos

Exposições	RC	Restrição calórica: <i>Caloric restriction</i> <sup>1,2</sup> , <i>Calorie restriction</i> ; Restrição dietética: <i>Dietary restriction</i> ; Restrição crônica da ingestão energética: <i>Chronic energy intake restriction</i>
Desfechos	Parâmetros comportamentais	Parâmetros comportamentais: <i>Behavioral parameters</i> ; Resposta comportamental: <i>Behavioral response</i> ; Comportamento exploratório: <i>Exploratory behavior</i> <sup>1,2</sup> ; Memória: <i>Memory</i> <sup>1,2</sup> ; Atividade motora: <i>Motor activity</i> <sup>1,2</sup> ; Ansiedade: <i>Anxiety</i> ; Labirinto em cruz elevado: <i>Elevated plus maze</i> ; Teste de reconhecimento de objeto: <i>Object recognition test</i> ; Teste de campo aberto: <i>Open field test</i> ; Esquiva inibitória: <i>Inhibitory avoidance</i> ; Labirinto aquático de Morris: <i>Morris water maze</i>

1 Termo encontrado no MeSH

2 Termo encontrado no DeCS

Os resultados da busca oriunda das combinações dos unitermos são apresentados na tabela 02. O único filtro utilizado na base de dados PubMed foi para estudos realizados com animais.

**Tabela 2:** Resultado quantitativo da busca literária realizada com as diferentes combinações nas principais bases de dados

Combinções	Base de dados		PubMed <sup>a*</sup>	Science Direct	SciELO <sup>**</sup>
1 Caloric restriction OR calorie restriction OR food restriction OR chronic energy restriction OR energy restriction	9210	5823	23451	105	
2 (Caloric restriction OR calorie restriction OR food restriction OR chronic energy restriction OR energy restriction) AND (anxiety)	82	48	2764	1	
3 (Caloric restriction OR calorie restriction OR food restriction OR chronic energy restriction OR energy restriction) AND (exploratory behavior)	43	39	423	0	
4 (Caloric restriction OR calorie restriction OR food restriction OR chronic energy restriction OR energy restriction) AND (memory)	156	105	3612	1	
5 (Caloric restriction OR calorie restriction OR food restriction OR chronic energy restriction OR energy restriction) AND (elevated plus maze)	24	21	418	1 <sup>#</sup>	
6 (Caloric restriction OR calorie restriction OR food restriction OR chronic energy restriction OR energy restriction) AND (open field)	46	39	774	1 <sup>#</sup>	
7 (Caloric restriction OR calorie restriction OR food restriction OR chronic energy restriction OR energy restriction) AND (Morris water maze)	29	23	540	0	

Legenda:

(a) Coluna da esquerda representa os resultados da busca sem o filtro para estudos experimentais animais, enquanto a coluna da direita contém o filtro.

\* Filtro “título/resumo” na combinação

\*\* Filtro para resumo que contivesse *caloric restriction* ou sinônimos e para o idioma inglês

# Mesmo artigo da busca anterior

## 2.1 RESTRIÇÃO CALÓRICA

### 2.1.1 Restrição calórica: visão geral

A RC é um regime dietético definido como a redução na quantidade diária total de alimentos com ausência de desnutrição, ou seja, é uma limitação da ingestão alimentar abaixo do nível *ad libitum*\* sem redução desproporcionada de qualquer componente da dieta, concomitante ao comprometimento da adequação de micronutrientes. Cabe ressaltar que RC não é restrição alimentar, pois ocorre a suplementação de micronutrientes (ADAMS et al., 2008; AMIGO; KOWALTOWSKI, 2014; MA et al., 2014a).

A RC é uma intervenção não genética que tem demonstrado como resultados aumentar a vida média e máxima de diversas espécies, desde organismos mais primitivos, como as leveduras, até os roedores. Além disso, é a forma de regime dietético com maior benefício para a expectativa de vida em roedores, quando comparado com restrições específicas, como a restrição proteica (MA et al., 2014b; GOULD et al., 1995).

A literatura científica disponibiliza como sinônimos de RC: restrição dietética (*dietary restriction*), restrição energética (*energy restriction*) e restrição energética crônica (*chronic energy restriction*). Todos esses sinônimos referem-se ao regime dietético no qual é restrita uma porcentagem da ingestão calórica total diária simultaneamente a manutenção da disponibilidade de micronutrientes com ausência de desnutrição (CERQUEIRA; KOWALTOWSKI, 2010).

Mattson utilizou o termo *hormese* para definir a RC, podendo ser representada por respostas bifásicas, ou seja, em porcentagens baixas é benéfica para as células e organismos, enquanto que em porcentagens elevadas, é inibitória e prejudicial (MATTSON, 2010). Essas doses referem-se às porcentagens aplicadas nos estudos, que variam entre os autores e de acordo com a finalidade do estudo, grande parte destes apresentam a faixa de RC correspondente a 20-40% da ingestão energética total diária do grupo controle (dieta *ad libitum*), ou

---

\* O termo *ad libitum* é o princípio que determina a necessidade energética do animal, ou seja, a sua ingestão alimentar voluntária. A interrupção do ato de comer geralmente significa que as necessidades energéticas foram alcançadas (RITSKES-HOITINGA; CHWALIBOG, 2003).

seja, o consumo do grupo restrição calórica é na faixa de 80-60% do grupo controle. O apêndice A apresenta a matriz de síntese com alguns estudos sobre RC, comportamento e suas respectivas porcentagem.

A RC é composta por duas formas de regimes dietéticos distintos: alimentação diária limitada (curto ou longo prazo) e jejum intermitente. A alimentação diária limitada está relacionada com o percentual de restrição comparado com aquele consumido pelos animais do grupo controle, com alimentação *ad libitum*, ou seja, a porcentagem de RC diária é baseada no consumo do grupo controle. O segundo regime é o jejum intermitente, caracterizado como jejum programado, ou seja, períodos intercalados entre a ingestão de alimentos e o jejum, o modo mais aplicado é o jejum em dias alternados. O animal é alimentado um dia e no outro ocorre a privação alimentar (LI; WANG; ZUO, 2013).

O estudo pioneiro da RC foi realizado em 1935 e teve como objetivo avaliar o efeito do crescimento retardado, induzido pela limitação calórica, em diferentes fases do ciclo de vida de ratos de ambos os sexos. Ao final dos quatro anos de estudo, os autores constataram que a RC após a puberdade aumentou a expectativa de vida e agiu beneficemente na prevenção ou atenuação de doenças crônicas nos roedores, principalmente aquelas ligadas ao envelhecimento (MCCAY C. M.; CROWELL M. F.; MAYNARD L. A, 1935).

A modalidade de RC que utilizou o jejum intermitente teve seu estudo pioneiro realizado em 1945. O estudo atribuiu ao regime dietético um aumento da expectativa de vida dos ratos (20% nos machos e 15% nas fêmeas), ausência de retardo no crescimento corporal e retardo no aparecimento de tumores mamários (CARLSON; HOELZEL, 1946).

Referente a outras doenças, esse regime dietético tem atuação relevante em cardiomiopatia, diabetes tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, aterosclerose, doenças autoimunes e câncer (CHOI et al., 2013; GENARO; SARKIS; MARTINI, 2009; GRÄFF et al., 2013). Além de doenças ligadas ao envelhecimento, a RC apresenta diversas implicações metabólicas, as duas principais funções favoráveis são a reprogramação metabólica ao metabolismo oxidativo, ou seja, obtenção de outras fontes energéticas no momento da privação alimentar, como a elevação da oxidação lipídica, além do melhoramento da resposta ao estresse, particularmente o estresse oxidativo (GUARENTE, 2013).

A RC é o modelo de intervenção dietética mais usada em estudos que envolvem envelhecimento, por isso, em muitos deles foi



verificado o seu papel benéfico em doenças ligadas à idade em modelos animais, como a Doença de Alzheimer, doença de Parkinson e acidente vascular cerebral. Além disso, promove ação protetora em doenças neurodegenerativas que levam à perda progressiva de neurônios, alterações na plasticidade sináptica e neurogênese, atrofia cerebral e déficit cognitivo (MATTSON et al., 2004; RIZZA; VERONESE; FONTANA, 2014).

A RC promove a redução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), aumento da biogênese mitocondrial, impede o dano e promove a reparação celular e do DNA, auxilia na resistência ao estresse, reduz inflamação e previne algumas alterações da expressão gênica que ocorrem com o envelhecimento (GENARO; SARKIS; MARTINI, 2009; GUARENTE, 2008; SZAFRANSKI; MEKHAIL, 2014).

Os efeitos da RC podem ser atribuídos ao retardo do envelhecimento celular associado às doenças. O possível mecanismo de inativação total ou parcial pela RC pode ser resultante do período de escassez alimentar, com isso, as células tornam-se capazes de entrarem em um modo de espera no qual a divisão e reprodução celulares são minimizadas ou interrompidas com o intuito de disponibilizar energia para manutenção orgânica. A manutenção do equilíbrio redox e consequente redução da produção dos radicais livres causadas pela RC podem proteger o organismo de doenças como aterosclerose, diabetes, artrite reumatoide, doenças neurodegenerativas e câncer (FONTANA; PARTRIDGE; LONGO, 2010; BORDONE; GUARENTE, 2005).

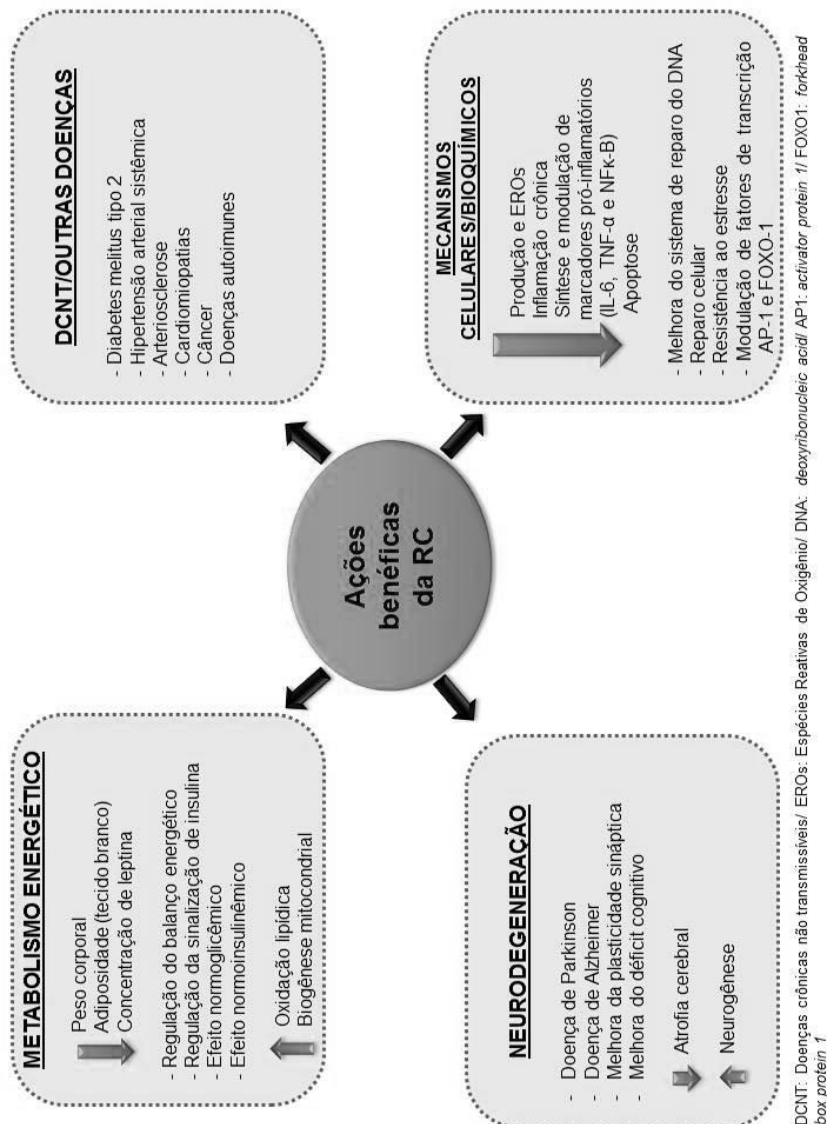
No metabolismo energético ocorre redução do peso corporal e da adiposidade corporal, aumento da oxidação lipídica, além da regulação da sinalização da insulina e da indução de reprogramação metabólica na maioria dos tecidos periféricos, com a finalidade de garantir energia suficiente (MA et al., 2014b; AMIGO; KOWALTOWSKI, 2014). Em roedores submetidos à RC de 30%, durante cinco semanas, houve incremento da oxidação de AG de aproximadamente quatro vezes em comparação ao grupo controle. Além disso, a obtenção energética proveniente dos AG no grupo RC foi de 37%, enquanto no grupo controle foi de 7%, demonstrando a adaptação do organismo durante a RC, ou seja, a reprogramação metabólica e energética (BRUSS et al., 2010).

A RC promove adaptações orgânicas como aumento da sensibilidade à insulina, mobilização de AG e produção de corpos cetônicos. Roedores em RC apresentaram um padrão de seleção de

combustível energético composto por duas fases: uma breve fase pós-alimentação com preferência por carboidratos e síntese endógena de AG, seguida de uma longa fase de oxidação dos mesmos, correspondendo aproximadamente a quatro vezes mais a atividade de oxidação do que o grupo controle. Essas adaptações metabólicas podem ter relação com o papel da RC no envelhecimento e aumento da longevidade (MATTSON, 2015; BRUSS et al., 2010; MASORO; YU; BERTRAND, 1982).

O ciclo resultante da RC consiste na queda da glicose sanguínea, levando a uma redução da secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas, diminuição do estoque lipídico no tecido adiposo branco (TAB) e, por fim, mudanças metabólicas, muscular e hepática. A redução do estoque lipídico no TAB também pode levar à elevação das concentrações de adiponectina e redução do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), resultando no aumento da sensibilidade à insulina, conforme esquematização a seguir (BORDONE; GUARENTE, 2005). A figura 1 resume as principais funções salutares da RC no metabolismo energético, doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) e outras doenças, além dos efeitos na neurodegeneração e nos mecanismos celulares/bioquímicos.

**Figura 1:** Ações benéficas da RC baseadas na literatura



Fonte: A AUTORA, 2016

Os mecanismos bioquímicos mediados pela RC no aumento da expectativa de vida e melhoras nas condições de saúde são diversos,

porém, algumas vias de sinalização destacam-se pela conservação ao longo da evolução das espécies. Fontana e colaboradores (2010) descreveram as vias de sinalização celular relacionadas com a RC desde as leveduras até os mamíferos e foi verificada a conservação de vias envolvendo o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) entre todas essas espécies (leveduras, vermes, moscas, peixes, roedores e macacos). Além do mTOR, a proteína cinase A (PKA) também sofre alteração pela RC nos mamíferos. Tanto o mTOR quanto a PKA têm inibição da ativação, sendo a inibição do mTOR diretamente ligada à ativação da autofagia, aumento da expectativa de vida e melhora de déficits cognitivos ligados ao avanço da idade (FONTANA; PARTRIDGE; LONGO, 2010; SOLON-BIET et al., 2015).

A atuação do TOR no cérebro envolve a participação em inúmeros mecanismos, dentre eles o mecanismo celular: controle da autofagia, tamanho, sobrevivência, migração e proliferação – neurogênese - celular; mecanismo de brotamento axonal, regeneração e mielinização, expressão dos canais de receptores iônicos e crescimento da espinha dendrítica; e mecanismos regulatórios: excitabilidade e sobrevivência neuronal, plasticidade sináptica, cognição, alimentação e controle do ritmo circadiano. Roedores em RC de 30% durante 44 semanas apresentaram redução do número de neurônios hipocâmpais imunopositivos para mTOR, concomitante ao aumento de neurônios hipocâmpais positivos para SIRT-1, fato envolvido na melhora da capacidade cognitiva desses animais (BOCKAERT; MARIN, 2015; MA et al., 2015).

Além de estudos com roedores, o Centro Nacional de pesquisas com primatas de Wisconsin (*Wisconsin National Primate Research Center- WNPRC*) desenvolve pesquisas com macacos rhesus desde 1989. Dentre os principais efeitos positivos da RC de 30% em longo prazo destacam-se o efeito protetor da RC sobre a mortalidade por todas as causas, redução da gordura corporal, redução da atividade do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e das concentrações plasmáticas de leptina. Além desses efeitos, os macacos rhesus em RC apresentaram incremento da sensibilidade à insulina e redução da concentração de glicose e insulina quando comparados com os animais do grupo controle (RAMSEY et al., 2000; COLMAN et al., 2009, 2014b).

Contrariamente aos resultados apresentados pelo WNPRC, o Instituto Nacional sobre envelhecimento (*National Institute on Aging- NIA*) cujas pesquisas são realizadas em macacos rhesus em condições experimentais semelhantes, não foi encontrado os mesmos resultados do

WNPRC. Os resultados referentes às alterações hormonais e metabólicas mediadas pela RC, que em conjunto resultaram na ausência de elevação da sobrevivência nos animais em RC quando comparados ao grupo controle, não foram verificados pelo NIA (CAVA; FONTANA, 2013).

A capacidade da RC de estender a vida em humanos ainda não é conhecida, mas os dados indicam que a RC moderada em longo prazo, juntamente com uma nutrição adequada, promovem efeitos protetores contra a obesidade, diabetes tipo 2, inflamação, hipertensão, doença cardiovascular e redução dos fatores de risco metabólicos associados ao câncer. Além disso, a RC em seres humanos melhora marcadores de envelhecimento cardiovascular, por meio, por exemplo, da indução da síntese de proteínas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo e da redução da inflamação crônica sistêmica e da frequência cardíaca basal (CAVA; FONTANA, 2013; RIZZA; VERONESE; FONTANA, 2014; RAVUSSIN et al., 2015; WEISS; FONTANA, 2011; HAN; REN, 2010). Em um estudo multicêntrico em humanos, cujo objetivo foi avaliar se a RC reduziria os níveis do IGF-1 durante dois anos de estudo. Como resultado não foi verificado o efeito positivo da RC nos níveis séricos de IGF-1, ou seja, ausência da redução dos níveis séricos, como foi observado em estudos experimentais animais (FONTANA et al., 2016).

Apesar de todos os benefícios atribuídos à RC em modelos saudáveis ou de neurodegeneração, efeitos prejudiciais, em alguns casos, são resultantes desse regime dietético. Camundongos em RC durante um longo tempo tiveram a cicatrização de feridas cutâneas prejudicada, sendo a situação revertida pela alimentação *ad libitum*. Somada a isso, a RC favoreceu a susceptibilidade dos roedores às infecções bacterianas, virais e parasitárias (FONTANA; PARTRIDGE; LONGO, 2010).

### **2.1.2 RC e seus papéis na função cerebral**

O declínio progressivo das funções cognitivas e um risco aumentado para doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson ou Alzheimer são consequências da senescência cerebral. Foi demonstrado que a RC atrasa o aparecimento dos sinais de senescência cerebral e, conseqüentemente, previne o aparecimento de distúrbios neurológicos, além de retardar eventos como a atrofia cerebral, perda de plasticidade sináptica e déficits cognitivos por meio da ativação da

SIRT-1 (FONTANA; PARTRIDGE; LONGO, 2010; GRÄFF et al., 2013).

As sirtuínas (SIRT) representam uma família grande e diversificada de enzimas que regulam a expressão gênica em diversos tecidos por meio da desacetilação de histonas. A RC induz o aumento dos níveis da expressão de, pelo menos, um subconjunto das sirtuínas: SIRT1, SIRT3 e SIRT5, sendo a SIRT-1 com atuação relevante na manutenção da saúde cerebral e sobrevivência neuronal (MAALOUF; RHO; MATTSON, 2009; GUARENTE, 2013). A SIRT-1 pode ser ativada pela RC e participar na regulação da proteção vascular e das células musculares lisas, o dano ao DNA, a regeneração das funções das células progenitoras endoteliais. Já a regulação negativa envolve a senescência, a produção de EROs e a formação de células espumosas (D'ONOFRIO et al., 2015).

Além da ação da RC sobre as sirtuínas, o regime dietético está envolvido em mecanismos cerebrais que abrangem a melhora da função mitocondrial, diminuição na expressão de fatores apoptóticos e aumento na atividade dos fatores neurotróficos (MAALOUF; RHO; MATTSON, 2009; MARTIN; MATTSON; MAUDSLEY, 2006).

Os fatores neurotróficos são proteínas envolvidas diretamente na proliferação e diferenciação de neurônios. Os principais representantes são: fator de crescimento neural (NGF), neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4 (NT-4), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator de crescimento similar à insulina (IGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (SEBBEN, ALESSANDRA DEISE et al., 2011).

Os fatores neurotróficos podem proteger neurônios, estimulando a produção de proteínas que reduzem o estresse oxidativo (enzimas antioxidantes e Bcl-2) e estabilizam a homeostase celular de cálcio. Dos fatores neurotróficos descritos, a RC atua na ativação da expressão do BDNF, NT-3, GDNF e IGF-1. O BDNF promove a diferenciação neuronal embrionária e em células progenitoras do hipocampo e parece estar aumentado em animais submetidos à RC, facilitando a plasticidade sináptica e aumentando os níveis de aprendizagem e memória. O decréscimo da concentração de IGF-1 e a regulação da sinalização da insulina podem ter um efeito direto sobre o estresse oxidativo, mediado pela RC, que pode ser uma relação causal com a capacidade de aprendizagem aperfeiçoada (MATTSON et al., 2004; CONTESTABILE, 2009; MA et al., 2014a).

Em um estudo experimental animal foi avaliado o efeito da RC de longa duração (12-15 meses) sobre o estresse oxidativo e fatores neurotróficos. A RC foi um fator protetor na morte neuronal induzida por apoptose, além disso, houve neuroproteção entre a associação da RC e o GDNF. Os autores concluem que, possivelmente, a defesa antioxidante mediada pela RC ocorre pela sinalização de fatores neurotróficos. RC (THRASIVOULOU et al., 2006). Foi observada a promoção da sobrevivência das células neurais recém-geradas em camundongos em RC, a análise constituiu num modelo de deleção gênica de BDNF e foi verificado que o aumento dos níveis do mesmo, induzido pela RC, desempenhou papel relevante na sobrevivência de neurônios. Juntamente aos achados experimentais, dados epidemiológicos fornecem fortes evidências de que a RC pode reduzir o risco para o desenvolvimento de doença de Parkinson e Alzheimer e acidente vascular cerebral, três das doenças neurodegenerativas mais devastadoras em idosos (MATTSON et al., 2004).

Em adição aos efeitos sobre fatores neurotróficos, a RC é capaz de induzir o aumento dos níveis da proteína de choque térmico neuronal (exemplo: *heat-shock protein-70*- HSP-70) e da proteína regulada por glicose (*glucose-regulated protein-78*) e induzir a atividade das proteínas chaperonas resistentes ao estresse (*stress-resistance protein chaperones*). O incremento dos níveis e indução da atividade dessas proteínas está relacionado à indução dos fatores neurotróficos e resistência ao estresse (MATTSON et al., 2004).

Fatores neuroprotetores e neurotrofinas são em grande parte dependentes do fator de transcrição CREB (*cAMP responsive-element binding protein*) em vários tecidos, inclusive no cerebral, participa de respostas neuroprotetoras e uma interação destacável é a do fator de transcrição CREB com a SIRT-1 (ALTAREJOS; MONTMINY, 2011; FUSCO et al., 2012).

Em um modelo de camundongos com deleção gênica de CREB-1 e SIRT-1, foi analisada a ação da RC de 40% durante cinco semanas. Os efeitos neuroprotetores mediados pela RC observados nos animais controle não foram evidenciados em ambos os grupos com deleção gênica. Ou seja, a neuroproteção da RC está diretamente ligada à expressão e atividade do CREB-1 e da SIRT-1. Além disso, apenas nos animais dos grupos controles em RC, houve aumento da potenciação de longa duração (do inglês *long-term potentiation*, LTP), evento relacionado à base celular e molecular da memória. Quanto ao comportamento, os animais dos grupos RC demonstraram melhora

na memória e na aprendizagem espacial durante o teste do reconhecimento de objeto, que os autores atribuíram à procura pelo alimento, devido à privação dos animais em RC (FUSCO et al., 2012).

Visto as possíveis vias de sinalização, proteínas e moléculas passíveis de alterações pela RC, podem-se resumir três mecanismos gerais: (1) o aumento da atividade sináptica: com consequente produção e liberação de fatores neurotróficos, que irão ativar as vias de sinalização que estimulam a formação de sinapses e plasticidade e neurogênese; (2) a ativação de respostas adaptativas ao estresse celular: resultam na mobilização defensiva contra o estresse oxidativo, metabólico e inflamatório; (3) os sinais periféricos: como os corpos cetônicos e fatores derivados do músculo, que auxiliam no aumento da demanda metabólica para as redes neuronais ativas (MATTSON, 2015).

### **2.1.3 Implicações terapêuticas da RC sobre os parâmetros comportamentais**

Alterações dietéticas têm implicações diretas nos parâmetros comportamentais e cerebrais, além disso, a porcentagem de RC pode afetar os desfechos esperados, sendo a RC de 30% o regime típico encontrado para aumentar a longevidade em roedores e proteger contra a neurodegeneração. A RC de 30% em um modelo animal roedor de neurodegeneração (camundongo com deleção gênica para CK-p25 - modelo da doença de Alzheimer) foi capaz de reduzir a neurodegeneração e atrasar a mesma, além do decréscimo da perda sináptica e preservação das capacidades cognitivas. Além disso, levou ao aumento transitório de glicocorticoides, que facilitam a LTP hipocampal, levando a melhorias na memória e na aprendizagem (FERREIRA et al., 2006; BISHOP; GUARENTE, 2007; GRÄFF et al., 2013).

A literatura científica apresenta escassas publicações de modelos animais com ausência de um quadro patológico que tenha a intervenção dietética do projeto. Contudo, foram selecionados alguns estudos que tenham apresentado tanto o rigor metodológico (descrição detalhada, tempo e composição do protocolo dietético), quanto a proximidade com o projeto desenvolvido, e, portanto, serão brevemente descritos a seguir.

Ferreira e colaboradores utilizaram um protocolo dietético de 30% de RC em roedores durante seis meses e avaliaram os efeitos da



dieta sobre a aprendizagem, memória e estresse dos animais. Como resultados estatisticamente significativos, verificaram que a atividade exploratória no grupo controle foi maior em relação ao grupo RC, enquanto que, no grupo RC foi observado maior desempenho quanto à aprendizagem (FERREIRA et al., 2006).

Graff e colaboradores avaliaram os efeitos da RC na capacidade cognitiva (locomoção, comportamento exploratório, medo e memória) em um modelo roedor de neurodegeneração e prejuízo cognitivo. Os animais foram divididos em três grupos: controle, grupo Ck-p25\* *ad libitum* e grupo Ck-p25 RC, tratados durante seis meses com RC de 30%. Os resultados apontaram preservação da integridade neuronal e da densidade sináptica, incremento do número de neurônios e de sinapses funcionais, além da melhora da plasticidade sináptica mediada pela RC. Referente à capacidade cognitiva, houve melhora da memória. Contudo, a RC não alterou as atividades referentes à ansiedade, locomoção e comportamento exploratório em relação ao grupo controle (GRÁFF et al., 2013).

Uma modalidade de RC progressiva\* em roedores foi aplicada para avaliação do efeito da RC nas funções neuronais, como aprendizagem e memória. Como principais resultados destacam-se a melhora da capacidade de aprendizagem espacial (memória) dependente do hipocampo, além de redução dos níveis glicêmicos e de IGF-1, quando comparados ao grupo controle (MA et al., 2014b).

Em estudos com restrição de 40% de calorias também foi verificada melhora em alguns aspectos comportamentais em roedores. RC de 40% desde os quatro meses de idade resultou em um significativo aumento na aprendizagem motora em comparação ao grupo alimentado *ad libitum*. Além disso, os animais em RC apresentaram melhor compreensão das exigências referentes à tarefa motora. O estudo concluiu que a RC impediu ou retardou os déficits de função neural e aprendizagem relacionadas à idade (GOULD et al., 1995).

Outro protocolo de 40% de RC com duração de seis meses foi aplicado em roedores para avaliação da memória espacial pelo labirinto aquático de Morris. Após os seis meses de intervenção, o grupo controle apresentou aumento da latência de escape em comparação ao grupo RC, ou seja, prejuízo na memória espacial. Já o

---

\* Modelo de neurodegeneração duplo transgênico

• A progressão foi de 10%, 20% e 30% durante a primeira, segunda e terceira semana em diante, respectivamente.

grupo RC demonstrou melhora na memória tanto pela redução do tempo para a realização e chegada ao alvo, quanto redução da latência na tarefa aquática em relação ao período antecedente a intervenção (GENG et al., 2011).

Um longo estudo com camundongos fêmeas objetivou avaliar os efeitos da RC de 40% sobre os parâmetros comportamentais e motores, com duração de 4, 20 e 74 semanas de RC, iniciada em 4 semanas de idade. A coordenação motora dos animais, analisada pelo teste *accelerod* não diferiu entre ambos os grupos e suas diferentes durações intervencionais. No teste do campo aberto, foi verificada redução da atividade horizontal e dos episódios de *rearings* dos animais com 4 semanas de duração da RC em relação ao seu controle, nos demais grupos não houve diferença. Em relação à avaliação do comportamento tipo ansioso, pelo labirinto em cruz elevado, o grupo com 4 semanas de RC apresentou maior número de entrada nos braços abertos em relação ao seu controle. Além disso, durante o teste foi verificada relação direta entre o aumento do tempo de RC e a redução significativa da entrada nos braços abertos. Por fim, a análise da memória, realizada pelo labirinto aquático de Morris, foi verificado que os animais com 4 semanas de RC não lembraram da localização da plataforma em relação ao grupo controle. Entretanto, no grupo com 74 semanas de RC, houve maior número de cruzamentos na plataforma no dia do teste quando comparado aos animais com a mesma idade. Como principais considerações finais, os autores apontam que a RC aumentou a memória de trabalho, entretanto, aumentou o comportamento tipo ansioso ao avançar a intervenção e o agravamento do da perda da coordenação motora relacionada com a idade (KUHILA et al., 2013).

Referente aos estudos que avaliem a RC e o processo cognitivo em humanos, destacam-se dois estudos americanos: CALERIE (*Comprehensive Assessment of Long-term Effects of Reducing Intake of Energy - Avaliação Compreensiva dos Efeitos em Longo Prazo da Redução da Ingestão de Energia*) e o ENCORE (*Exercise and Nutrition Interventions for Cardiovascular Health- Exercício e Nutrição Intervenções para a Saúde Cardiovascular*).

No estudo CALERIE, 48 participantes foram randomizados para quatro grupos: controle (manutenção do peso: idade média de  $37\pm 7$  anos), RC (25% de RC: idade média de  $39\pm 5$  anos), RC mais exercício estruturado (12,5% de RC e 12,5% aumento do gasto energético por meio do exercício: idade média de  $36\pm 6$  anos) e dieta de baixa caloria (890 kcal/dia até 15% de perda de peso, seguida pela manutenção do peso: idade média de  $38\pm 8$  anos) com intervenção de

seis meses. Os testes cognitivos (memória verbal, memória visual, atenção/concentração) foram realizados no início do estudo e no terceiro e sexto mês. Nenhum padrão consistente de memória verbal, retenção/memória visual, ou de déficits de atenção/concentração surgiram durante o julgamento. Déficit energético diário não foi significativamente associado com a mudança no desempenho no teste cognitivo (MARTIN et al., 2007).

O estudo ENCORE foi realizado com 124 participantes, de idade de  $52 \pm 9$  anos, com elevada pressão arterial (PA) - PA sistólica de 130 a 159 mmHg ou PA diastólica de 85 a 99 milímetros Hg) que eram sedentários e com sobrepeso ou obesidade (IMC: 25-40  $\text{kgm}^2$ ). Os participantes foram randomizados para um grupo *Dietary Approaches to Stop Hypertension* (DASH<sup>\*</sup>), outro grupo DASH com exercício físico e RC, por fim, um grupo com dieta controle. Os participantes completaram uma bateria de testes neurocognitivos de memória de aprendizagem e velocidade psicomotora, realizados no início e após quatro meses de intervenção. Como resultados dos testes neurocognitivos, os participantes do DASH combinada com exercício físico e RC apresentaram melhorias na função de memória de aprendizagem e velocidade psicomotora em relação ao controle, com dieta habitual. Apesar dos resultados positivos, os autores trazem como limitações do estudo: (1) tempo curto de intervenção; (2) o tamanho amostral; (3) a dificuldade de obtenção da participação isolada da RC nos resultados; e (4) a interferência da medicação (SMITH et al., 2010).

Tendo em vista as distinções referentes aos modelos experimentais animais, as porcentagens e tempo de RC, os testes comportamentais utilizados e seus consequentes resultados, adicionou-se ao documento o APÊNDICE A: Matriz de síntese com estudos sobre RC e comportamento. Nele, constam alguns estudos do protocolo dietético e seus principais resultados.

---

\* A dieta DASH preconiza o consumo de frutas, verduras, produtos lácteos com baixo teor de gordura, cereais integrais, peixe, aves e nozes, e, ao mesmo tempo, incentiva menor consumo de carne vermelha, doces e açúcares (PIPER et al., 2012).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi analítico intervencional, experimental animal e controlado. Os estudos experimentais são caracterizados pela comparação do efeito da intervenção entre o grupo controle e os grupos experimentais, possibilitando o estudo de relações causais entre os tratamentos ou intervenções aplicadas e suas respectivas respostas observadas (BONITA; BEAGLEHOLE; KJELLSTROM, 2010; FESTING; WEIGLER, 2003).

#### 3.2 PROCEDIMENTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Este projeto foi enviado para a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC e foi aprovado sob o número de protocolo 00973 (ANEXO A).

#### 3.3 ENSAIO BIOLÓGICO

Foram utilizados 18 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, 9 animais por grupo, com idade inicial de 60 dias, idade na qual são considerados adultos jovens (MCCUTCHEON; MARINELLI, 2009). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e foram mantidos e tratados no Laboratório de nutrição experimental. A randomização inicial dos animais nos dois grupos experimentais consistiu na pesagem no dia em que chegaram ao laboratório. Posteriormente foi calculada a média de peso corporal dos animais, no caso de distinção expressiva da média, o animal foi permutado para o outro grupo, para que não houvesse diferenças expressivas na média do peso inicial.

Os animais foram mantidos em condições de luz e temperatura controladas, ciclo claro-escuro de 12 horas, a  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , acesso à água *ad libitum*. Foram acondicionados três animais por caixa, conforme o estudo de Ferreira e colaboradores (2006). Os animais não foram mantidos isolados, pois para os roedores, o isolamento social é um fator estressante que pode regular negativamente os parâmetros comportamentais que foram analisados (ZAINUDDIN; THURET, 2012; WALF; FRYE, 2007).

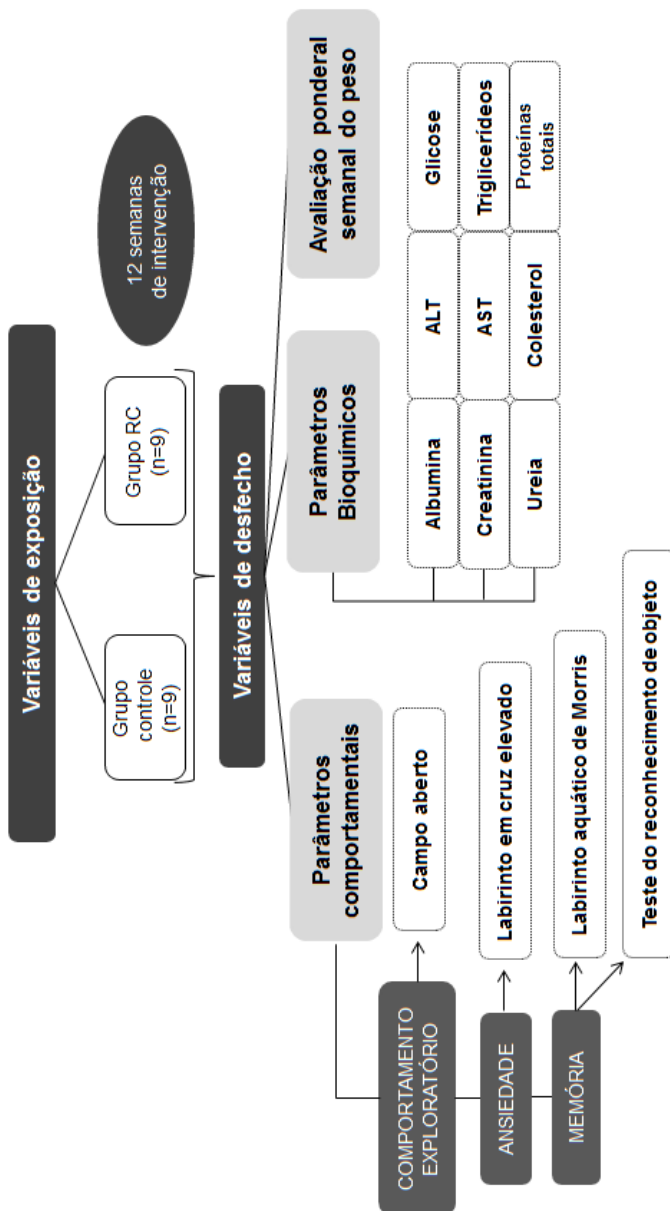
O grupo 01 correspondeu ao controle e recebeu a ração formulada a partir das orientações do *American Institute of Nutrition*- AIN93

(REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), adaptada para as condições experimentais, *ad libitum*.

O grupo 02 foi o grupo com regime dietético de RC e recebeu, assim como o grupo 01, a ração formulada, porém, o grupo teve RC progressiva em relação à média semanal de consumo do controle, 10% na primeira semana, evoluindo para 20% na segunda semana, e, passou para 30% na terceira semana, seguindo desta forma até o final do experimento. Foi desenvolvida conforme estudos prévios baseados na mesma modalidade de RC (MA et al., 2014a; RIBEIRO et al., 2009; COLMAN et al., 2014b).

As variáveis de exposição do estudo foram os dois grupos com duas dietas, com duração de 12 semanas de intervenção. As variáveis de desfecho foram relacionadas ao parâmetro comportamental dos animais: comportamento tipo ansioso, comportamento exploratório e memória, cuja avaliação foi realizada por meio dos seguintes testes: teste do labirinto em cruz elevado (TCE), campo aberto (TCA) e labirinto aquático de Morris (LAM) e teste do reconhecimento de objeto (TRO), respectivamente. Além disso, foi analisado o parâmetro bioquímico, cujas variáveis são descritas na figura 2.

**Figura 2:** Fluxograma do estudo



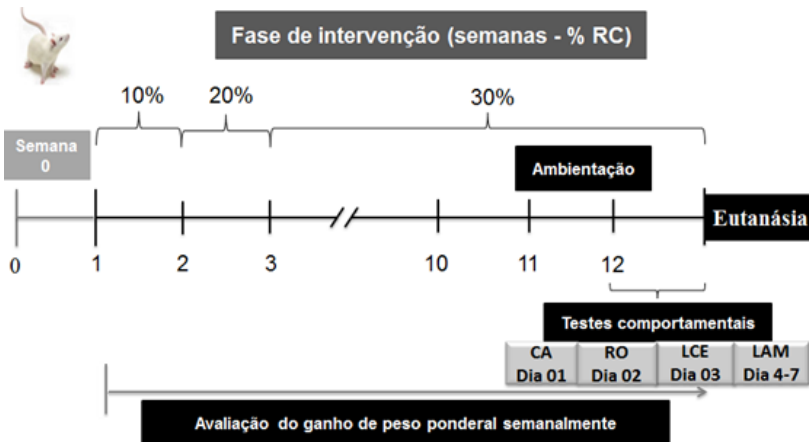
Fonte: A AUTORA, 2016

Após as doze semanas de intervenção, os animais foram submetidos aos testes comportamentais e ao teste de tolerância à glicose (TTG). Após esses processos, foram anestesiados com cetamina (100ml/kg intraperitoneal) e xilazina (10ml/kg intraperitoneal), realizada a punção cardíaca para obtenção do sangue para análises bioquímicas e, por fim, foram eutanasiados pelo método físico de decapitação, com posterior coleta dos materiais biológicos.

### 3.4 DESENVOLVIMENTO DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA

#### 3.4.1 Mensuração da média do consumo alimentar semanal do grupo controle

**Figura 3:** Linha temporal do estudo



Legenda: CA: Campo aberto; RO: Reconhecimento de objeto; LCE: Labirinto em cruz elevado; LAM: Labirinto aquático de Morris.

FONTE: A AUTORA, 2016

A etapa de mensuração da média do consumo alimentar semanal dos animais foi realizada uma semana prévia ao início do experimento, denominada de semana 0, conforme demonstrado na figura acima.

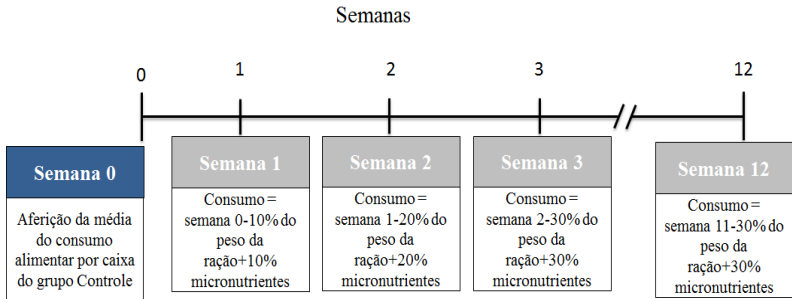
Os animais do grupo controle, com idade inicial de 53 dias, foram alimentados *ad libitum* com a ração formulada, para o cálculo da média do consumo alimentar diário por caixa e para o cálculo da RC de 10% na semana 01. Ao início do ciclo escuro, ofertou-se diariamente 180 gramas de ração por caixa, quantidade esta que garantiu o consumo livre de ração por caixa. No dia seguinte, previamente à oferta da ração, o



remanescente da ração foi pesado e anotada a quantidade em planilhas do consumo semanal (exemplificada no APÊNDICE B), para então, ser calculada a média do consumo alimentar semanal do grupo controle. Dessa forma, a porcentagem de restrição calórica acompanhou tanto o crescimento dos animais, quanto o que foi consumido pelo grupo controle semanalmente. A RC foi semanalmente baseada no consumo de ração do grupo controle, com isso, o consumo acompanhou diretamente o crescimento natural do animal, fazendo com que a restrição não passasse da porcentagem máxima almejada de 30%.

A necessidade de calcular a média de consumo diário e não baseá-la na literatura ocorreu pela distinção de formulação e palatabilidade da dieta preparada em comparação com as rações comerciais. A modalidade de RC foi baseada na redução do peso da ração úmida oferecida aos animais, por isso, para não restringir micronutrientes, foi adicionada a porcentagem de micronutrientes correspondente à quantidade de RC semanal, conforme a esquematização da figura 4.

**Figura 4:** Esquematização da progressão da RC no decorrer do experimento



Fonte: A AUTORA, 2016

### 3.4.2 Formulação das dietas

A composição das dietas utilizadas no projeto de pesquisa está descrita na tabela 3, caracterizam-se como isocalóricas e são apresentadas na proporção dos componentes por 100 gramas de ração. Nota-se a adição de micronutrientes no grupo RC, pois esta não foi realizada com a redução de ingredientes que forneçam calorias, mas sim, com a redução do peso de ração úmida oferecida aos animais.

A ração foi formulada duas vezes na semana, a partir de ingredientes descritos na tabela 3. Todos os ingredientes, com exceção

do óleo de soja, foram obtidos na forma de pó, por isso, para a formulação da ração, foi acrescida água à mistura seca, na proporção 1:1. A cada semana, a ração foi porcionada conforme cálculo prévio para o grupo RC e para o grupo controle, porcionada 180 gramas para cada caixa. Após a formulação, a ração foi pesada, porcionada e embalada em papel alumínio e em sacos plásticos com identificação de data de formulação e quantidade porcionada para cada grupo de intervenção. Após o preparo, foi mantida sob refrigeração até a oferta aos animais, próximo ao início do ciclo escuro (17h:00/18:00h).

Tendo em vista que a formulação da ração continha sacarose, ingrediente que poderia sofrer alterações durante o processo de aquecimento, a mistura não foi colocada em estufa ou peletizada. O aquecimento pode levar à caramelização ou decomposição dos açúcares, bem como, perda de voláteis ou alterações do perfil lipídico (PARK; ANTONIO, 2006).

**Tabela 3:** Formulação das dietas do estudo: controle e RC (g/100g)

INGREDIENTES	CONTROLE	RC <sup>#</sup>
Amido de milho	51	51
Proteína de soja isolada <sup>a</sup>	25	25
Sacarose	10	10
Óleo de soja	4	4
Fibra (celulose microfina) <sup>b</sup>	5	5
Mistura de minerais <sup>c</sup>	3,5	4,55
Mistura de vitaminas <sup>c</sup>	1	1,3
L-cistina <sup>d</sup>	0,18	0,234
L-metionina <sup>d</sup>	0,18	0,234
Bitartarato de colina <sup>d</sup>	0,25	0,325
Tetrabutyl-hidroquinona <sup>d</sup>	0,0008	0,00104

Legenda:

# Considerando RC de 30%, portanto, incremento de 30% dos micronutrientes

(a) Proteína de soja isolada (ISP SUPRO 783, Tovani Benzaken, Brasil)

(b) Celulose microfina (Rhooster, Brasil)

(c) Mix de vitaminas e minerais AIN-93 (Rohster, Brasil)

(d) L-cistina, L-metionina, bitartarato de colina e tetrabutyl-hidroquinona (Rhooster, Brasil)

A composição da dieta foi baseada na AIN-93, contudo, algumas modificações foram realizadas. A proteína de soja isolada substituiu a caseína, e para garantir as necessidades proteicas, a proporção da proteína de soja isolada correspondeu a 25%,

porcentagem semelhante a estudos prévios (DE ASSIS et al., 2015, 2012). Foi adicionada a L-metionina, com a finalidade de completar a composição de aminoácidos da proteína de soja isolada. O amido dextrinizado foi retirado e a proporção do ingrediente foi acrescentada à proporção de amido de milho, cujo cálculo correspondeu à diferença percentual para completar 100%, ou 100g da ração. A proporção de metionina e cistina basearam-se no estudo de Byington e Howe do ano de 1972

A garantia de manutenção dos micronutrientes (mix de vitaminas, mix de minerais, L-cistina, L-metionina, bitartarato de colina e tetra-hidroquinona) no experimento foi garantida com incremento progressivo de 10% a 30%, conforme a RC avançar durante as semanas. Os quadros 1 e 2 descrevem a composição da mistura de minerais e vitaminas (g/kg da mistura), respectivamente, conforme indicações da AIN-93M.

**Quadro 1:** Composição da mistura de minerais contida na ração

<b>Elementos minerais essenciais (g/kg da mistura)</b>	
Carbonato de cálcio anidro (40,04% Ca)	357
Fosfato de potássio monobásico (22,76% P; 28,73% K)	250
Citrato de potássio, tripotássio, monoidratado (36,16% K)	28
Cloreto de sódio (39,34% Na; 60,66% Cl)	74
Sulfato de potássio (44,87% K; 18,39% S)	46,60
Óxido de magnésio (60,32% Mg)	24
Citrato de ferro (16,5% Fe)	6,06
Carbonato de zinco (52,14% Zn)	1,65
Carbonato de manganês (47,79% Mn)	0,63
Carbonato de cobre (57,47% Cu)	0,30
Iodato de potássio (59,3% I)	0,01
Selenato de sódio anidro (41,79% Se)	0,01025
Paramolibdato de amônio tetraidratado (54,34% Mo)	0,00795
<b>Elementos minerais potencialmente benéficos</b>	
Metassilicato de sódio nonaidratado (9,88% Si)	1,45
Sulfato de cromo e potássio dodecaidratado (10,42% Cr)	0,275
Cloreto de lítio (16,38% Li)	0,0174
Ácido bórico (17,5% B)	0,0815
Fluoreto de sódio (45,24% F)	0,0635
Carbonato de níquel (45% Ni)	0,0318
Vanadato de amônio (43,55% V)	0,0066
Sacarose	209,806

Fonte: COSTA, 2014

**Quadro 2:** Composição da mistura vitamínica contida na ração

<b>Composição da mistura vitamínica (g/kg da mistura)</b>	
Ácido nicotínico	3
Pantotenato de calico	1,6
Piridoxina-HCl	0,7
Tiamina-HCl	0,6
Riboflavina	0,6
Ácido fólico	0,2
D-biotina	0,02
Vitamina B12 (cianocobalamina: 0,1% em manitol)	2,5
Vitamina E (all-rac- $\alpha$ -acetato de tocoferila: 500UI/g)	15
Vitamina A (all-transpalmitato de retinil: 500.000 UI/g)	0,8
Vitamina D (colecalfiferol: 400.000UI/g)	0,25
Vitamina K (fitoquinona)	0,075
Sacarose	974,66

Fonte: COSTA, 2014

### 3.5 ANÁLISE COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS

Os testes comportamentais foram realizados na forma de bateria, durante a última semana de intervenção (12<sup>a</sup> semana), tendo uma semana prévia de ambientação. Houve a necessidade da semana de ambientação devido à necessidade de transportar os animais do laboratório de Nutrição experimental para o departamento de Farmacologia, local onde foram realizados os testes comportamentais. Como o transporte e a mudança de biotério podem afetar o desfecho comportamental, foi realizada a ambientação, para adaptação dos animais ao novo biotério.

A bateria de teste consistiu na avaliação do comportamento exploratório, memória e do comportamento tipo ansioso, respectivamente pelos testes: campo aberto, reconhecimento de objetos, labirinto em cruz elevado e labirinto aquático de Morris, conforme esquematizado na linha temporal do estudo (figura 3).

### 3.5.1 Teste de campo aberto: Atividade locomotora

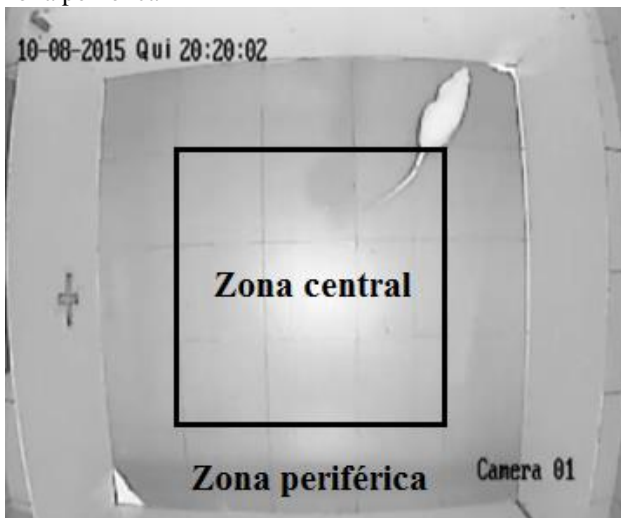
O primeiro teste da bateria foi o campo aberto cujo objetivo foi analisar a atividade locomotora dos animais, conforme realizado em estudo prévio (MATHEUS et al., 2016).

Cada sessão de teste teve duração de 15 minutos em um aparato fabricado de madeira, recoberto com fórmica impermeável e dimensão quadrada (100cmx100cm), paredes brancas e piso cinza (figura 5).

Cada animal foi colocado no centro do aparato e foram registradas as seguintes variáveis: distância total percorrida, número de episódios de *rearings*\* (elevações), tempo gasto na zona central, tempo gasto na zona periférica e número de entradas em ambas as áreas.

A análise da atividade locomotora foi filmada e analisada por meio do *software* AnyMaze®. Entre cada sessão, o aparato foi higienizado com álcool 10%.

**Figura 5:** Unidade do CA utilizada com representação esquemática da zona central e zona periférica



Fonte: Vídeo-gravação do teste para a Dissertação, 2016.

As variáveis etológicas que podem ser avaliadas no teste do campo aberto são apresentadas no quadro 3.

---

\* *Rearings* são considerados marcadores de atividade exploratória vertical.

**Quadro 3:** Variáveis etológicas observadas no teste do CA

1) Frequência na área central: frequência na qual o animal entra, com as quatro patas, no centro da arena
2) Frequência na área periférica: frequência na qual o animal entra, com as quatro patas, na periferia da arena
3) Duração na área central: tempo total que o animal permanece no centro da arena
4) Duração na área periférica: tempo total que o animal permanece na periferia da arena
5) Quadrados centrais: número total de quadrados centrais percorridos pelo rato
6) Quadrados periféricos: número total de quadrados periféricos percorridos pelo rato
7) Tempo de locomoção central: tempo de locomoção no qual o animal permaneceu na região central da arena
8) Tempo de locomoção periférica: tempo de locomoção no qual o animal permaneceu na região periférica da arena
9) Distância percorrida em um período de tempo (com o uso de <i>software</i> de análise)

Fonte: CAROLA et al., 2002.

**3.5.2 Teste do reconhecimento de objeto: Memória de curto prazo**

O teste de reconhecimento do objeto foi baseado no protocolo descrito por Bevins & Besheer (BEVINS; BESHEER, 2006), com uso de três objetos (dois objetos familiares e um novo) para avaliar a memória de curto prazo. Foi utilizado o mesmo aparato empregado no teste do campo aberto e consistiu em três fases distintas: a habituação, amostra e discriminação.

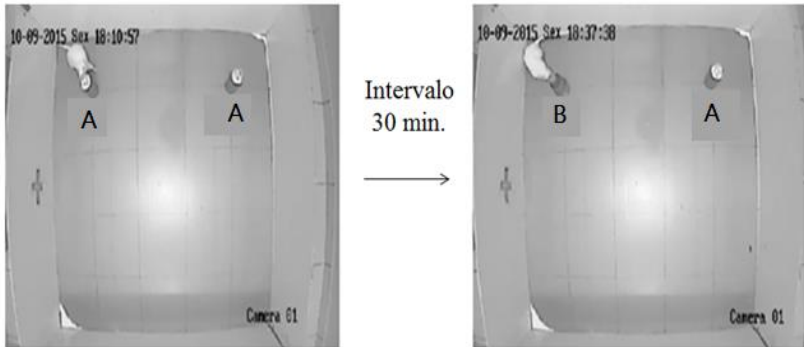
Durante a fase de habituação, um dia previamente ao teste, os animais exploraram o aparato durante quinze minutos. Na fase de amostra, 24 horas depois da fase de habituação, foram colocados dois objetos idênticos (A) em cantos opostos e distantes das paredes do aparato, de modo a garantir a circulação do animal pelo raio do objeto, para cinco minutos de exploração livre pelos animais. Previamente a fase de discriminação, houve um intervalo no qual os ratos permaneceram durante 30 minutos nas suas respectivas caixas.

Durante a fase de discriminação, foram utilizados um objeto familiar (A) e um objeto novo (B), para serem explorados durante 5 minutos (figura 8). A localização do novo objeto B foi aleatoriamente permutada a cada sessão com os animais.

A exploração de um objeto foi definida como o momento no qual o animal se dirigiu o focinho para o objeto a uma distância menor a 2 cm e/ou tocou-o com o focinho, não foi considerada exploração a subida do animal no objeto. A cada sessão dos animais, o aparelho e os objetos utilizados no teste foram limpos com álcool 10%.

Por fim, para análise foram consideradas as seguintes medidas na análise da memória: Tempo de exploração dos objetos durante as fases de amostra e discriminação e índice de discriminação. O índice de discriminação foi calculado pela razão entre o tempo de exploração do objeto novo e a somatória da exploração do objeto novo e do objeto familiar, sendo a razão, posteriormente multiplicado por 100.

**Figura 6:** Teste do RO - À esquerda: fase de amostra. À direita: fase de discriminação



Fonte: Vídeo-gravação do teste para a Dissertação, 2016.

A memória durante o teste envolve a preferência do animal pelos objetos. A memória recente é representada pela preferência ao objeto novo e a memória remota quando há preferência pelo objeto familiar. Além disso, pode haver a fase intermediária, na qual é dada a mesma atenção para ambos os objetos, por fim, a preferência nula, quando o animal não apresenta interesse em nenhum objeto, porém, demonstra interesse no deslocamento pelo aparato (ANTUNES & BIALA, 2012).

Os parâmetros relevantes quando os objetos são apresentados consistem no número de abordagens para um objeto e a preferência ou aversão por um objeto em detrimento de outro (SEIBENHENER &

WOOTEN, 2014). Além desses, podem ser avaliados os índices de memória, referentes à habituação aos objetos familiares e à discriminação entre o objeto familiar e o novo (ENNACEUR & DELACOUR, 1988).

As medias etológicas que podem ser avaliadas no teste do reconhecimento de objeto incluem:

**Quadro 4:** Medidas etológicas avaliadas no teste do RO

Exploração	Habituação	Discriminação
$e1 = A1 + A2$	$h1 = e1 - e2$	$d1 = B - A$
$e2 = A3 + B$		$d2 = d1 / e2$

Legenda: e1 é o tempo gasto na exploração de ambos os objetos familiares (A1 e A2) na fase de amostra; e2 é o tempo gasto na exploração do objeto familiar (A3) e o novo objeto (B) na fase de discriminação; h1 é a medida da habituação global na fase de exploração (e1) e de discriminação (e2); d1 e d2 são medidas de discriminação entre o objeto novo (B) e o familiar (A). Adaptado: SIK et al. 2003

### 3.5.3 Teste do labirinto em cruz elevado: Comportamento tipo ansioso

O teste do labirinto em cruz elevado foi aplicado para avaliar nos animais comportamento tipo ansiolítico e comportamento tipo ansiogênico após o tratamento dietético, conforme protocolo proposto por Walf e Frye (2007). O aparato utilizado é fabricado com madeira e fórmica, dois braços abertos (50cm x 10cm), dois braços fechados (50cm x 10cm x 40cm), área de junção central (10cm x 10cm) e suspenso 50cm do chão, conforme ilustrado na figura 6.

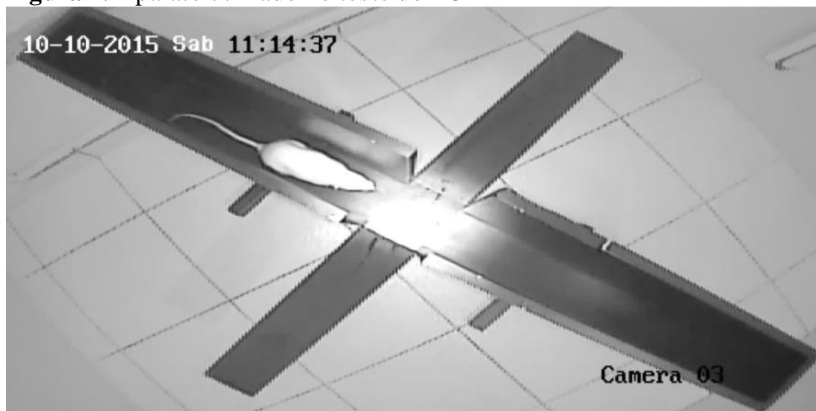
Cada animal, ao início do teste, foi colocado na junção dos braços, de frente para o braço fechado e foi temporizado cinco minutos para exploração do aparato. O método de coleta dos dados consistiu do vídeo-rastreamento e análise dos vídeos por meio do *software AnyMaze*<sup>®</sup> para contabilizar as entradas nos braços abertos e fechados, bem como o tempo gasto em cada um deles e a porcentagem de entrada nos braços abertos (calculado pela razão entre o número de entrada nos braços abertos e o número total de entrada nos braços).

A entrada do animal em um braço aberto foi considerada quando as quatro patas estavam dentro de um dos braços e a saída considerada quando pelo menos duas patas deixaram um dos braços. A



cada sessão o aparato foi limpo com álcool 10% e higienizado com folhas de papel para remoção de possíveis odores.

**Figura 7:** Aparato utilizado no teste do LCE



Fonte: Vídeo-gravação do teste para a Dissertação, 2016.

As principais variáveis etológicas avaliadas durante o teste incluem:

**Quadro 5:** Variáveis etológicas observadas no LCE

1) Entrada no braço aberto: movimento do animal da junção dos braços para um dos abertos
2) Entrada no braço fechado: movimento do animal da junção dos braços para um dos fechados
3) Retorno: o animal entra no braço aberto apenas com as patas dianteiras e, rapidamente, retorna ao braço fechado
4) <i>Sniffing</i> : exploração olfativa do ambiente imóvel ou em movimento
5) <i>Rearings</i> : postura ereta com as pernas dianteiras se movendo no ar ou apoiadas nas paredes laterais
6) <i>Grooming</i> : comportamento de autolimpeza
7) Episódios de defecação e micção durante o período de teste
8) <i>Head-dipping</i> : inclinação da cabeça no sentido da base inferior dos braços abertos
9) <i>Stretch</i> : o animal distende o corpo sem deslocar as patas traseiras durante o ato e retorna à posição anterior

Fontes: ESPEJO 1997; CAROLA et al., 2002; PINTO et al., 2012

### 3.5.3 Labirinto aquático de Morris: Memória espacial

O labirinto aquático de Morris foi utilizado para avaliação da memória espacial dos animais, o protocolo aplicado foi baseado estudos anteriores (CASTRO et al., 2013; SOARES et al., 2013; VORHEES; WILLIAMS, 2006), cuja duração correspondeu a quatro dias, sendo três deles de treino e o último dia de teste.

Uma piscina redonda, fabricada com material plástico, com diâmetro de 1,60m e 82cm de altura, foi dividida em quatro quadrantes representados pelos pontos cardiais (norte, sul, leste e oeste), sendo a plataforma localizada na posição noroeste, cujas dimensões corresponderam a 10cmx13cm. A piscina foi cheia com água até a altura de 54 cm e a plataforma foi submergida a 1cm.

Cada período de treinamento consistiu em quatro ensaios, nos quais os animais eram aleatoriamente posicionados nos quadrantes e teve duração de 60 segundos cada ensaio, a ordem aleatória de início foi seguida para todos os animais. O objetivo dos treinos era que o animal encontrasse a plataforma e nela permanecesse por 10 segundos, caso não encontrasse, o animal era gentilmente conduzido. Após cada ensaio dos treinos, foi dado intervalo de 20 segundos, no qual o animal era acondicionado provisória e individualmente em uma caixa. Durante os dias de treinos, foi analisada a latência de escape, que consiste no tempo em segundos que o animal desprende para encontrar a plataforma.

No quarto dia, o dia de treino, a plataforma foi retirada e os animais nadaram durante 60 segundos. Foram analisadas as variáveis: velocidade média, distância total percorrida, número de entradas na plataforma, tempo na zona da plataforma e latência para primeira entrada na zona que seria a plataforma.

**Figura 8:** Aparato do LAM e a representação esquemática dos quadrantes e plataforma



Fonte: Vídeo-gravação do teste para a Dissertação, 2016.

As variáveis etológicas que podem ser analisadas durante as fases de treino e teste do LAM incluem:

**Quadro 6:** Principais variáveis etológicas avaliadas no LAM

Treinos:
1) Latência de escape: tempo em segundos que o animal leva para encontrar a plataforma em cada <i>trial</i>
Teste:
2) Latência de escape para entrada no alvo: tempo em segundos para primeira entrada do animal no exato local em que estaria a plataforma
3) Número de cruzamentos no quadrante da plataforma: número de vezes que o animal cruza o quadrante em que estaria a plataforma
4) Tempo no quadrante da plataforma: tempo em segundos que o animal permanece no quadrante da plataforma durante os 60 segundos de teste
5) Distância total percorrida: distância em metros percorrida pela animal durante os 60 segundos de teste
6) Velocidade média: velocidade que o animal atinge durante o teste. Variável apresentada em metros por segundo.

Fonte: QUILLFELDT, 2006

### 3.6 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

Após o término dos testes comportamentais, os animais foram submetidos ao TTG. Os animais foram mantidos em jejum prévio (15 horas) para mensurar a glicemia, utilizando o sangue da cauda e um glicosímetro (Accu-Check Performa, São Paulo, Brasil). Após, foi aplicada injeção intraperitoneal contendo solução de dextrose (4g/kg peso em solução salina) e retirada as amostras sanguíneas para os três posteriores momentos (30, 60 e 120 min após a injeção). O valor de dextrose por peso do animal, bem como o tempo de jejum foi definido após padronização prévia no laboratório (dados não mostrados).

A partir das aferições glicêmicas, foi construída a curva de tolerância à glicose.

### 3.7 PESO E MARCADORES DO ESTADO NUTRICIONAL

#### 3.7.1 Avaliação ponderal do peso e estruturas corporais

Os animais foram pesados semanalmente com a utilização de uma balança (Kern 440-53) e um recipiente com tampa para que permanecessem parados e a aferição fosse realizada precisamente.

No dia da eutanásia, as estruturas corporais (fígado, músculo e tecido adiposo) dos animais foram retiradas e pesadas numa balança de precisão para posterior retirada de alíquotas para futuras análises.

#### 3.7.2 Marcadores bioquímicos

##### 3.7.2.1 Análise do soro

As análises bioquímicas dos parâmetros bioquímicos sanguíneos do estado nutricional (albumina, triglicérides, colesterol total, creatinina, AST, ALT e ureia) foram realizadas utilizando kits comerciais (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais) e as análises bioquímicas foram realizadas em equipamento automatizado Cobas Mira Plus (Roche Diagnósticos, Basel, Suíça).

##### 3.7.2.2 Dosagem de proteínas totais

As proteínas totais foram determinadas segundo o método de Bradford (DODD; BRADFORD, 1976), utilizando a albumina bovina como padrão. Resumidamente, alíquotas de amostra (50 µL) foram

adicionadas a 2,0mL do reagente de trabalho (Coomassie Blue) e mantidas em ambiente escuro por cinco minutos. A leitura da absorbância foi realizada em 595 nm no equipamento espectrofotômetro.

### 3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram tabulados no programa Microsoft Office Excel<sup>®</sup> 2010. A análise estatística foi realizada no programa estatístico Statistica<sup>®</sup> versão 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) e os gráficos foram desenvolvidos no *software* GraphPadPrism versão 5.0, versão para Windows.

Para teste de normalidade de distribuição dos dados, foi aplicado o teste Shapiro-Wilk, além da análise do desvio-padrão (menor do que a metade da média), do skewness e kurtosis. Quando simétricos, os dados foram expressos na forma de média e erro-padrão e, quando assimétricos, descritos por meio de mediana e intervalo interquartil.

Para analisar as diferenças entre os grupos no desempenho dos testes comportamentais, das variáveis bioquímicas e do peso final e inicial dos animais foi utilizado o teste-t Student, entre os grupos controle e RC. Para a variável assimétrica, foi aplicado o teste de Mann-Whitney.

Para análise do peso dos animais ao longo do experimento, teste de tolerância à glicose e dias de treino no labirinto aquático de Morris foi utilizado o teste ANOVA de medidas repetidas. O peso/glicose/latência de escape foram os fatores e o tempo (em semanas/dia) foi a medida repetida. Em caso de diferença, foi aplicado o *post hoc* Bonferroni.

Para todos os testes estatísticos realizados, foi adotado o nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).



## 4 RESULTADOS

Os resultados provenientes do projeto de dissertação serão submetidos na forma de artigo ao periódico *The Journal of Nutritional Biochemistry*, cujo qualis na Nutrição é A1 e o fator de impacto (2015) é 4,668. As normas de submissão ao periódico desejado estão disponíveis no seguinte *link*: <http://www.jnutbio.com/content/authorinfo#idp1469936>.

### **Efeitos do protocolo de restrição calórica progressiva sobre parâmetros comportamentais e do estado nutricional em ratos Wistar machos.**

**RESUMO:** Estudos experimentais animais sobre a restrição calórica (RC) sem desnutrição, aplicados durante a fase adulta, têm sugerido ações salutares. Dentre estes, efeitos benéficos cerebrais, ligados ao comportamento. Por isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da restrição calórica na atividade locomotora, comportamento tipo ansioso e memória dos animais submetidos a um protocolo de restrição calórica progressiva, bem como analisar a implicação da dieta em parâmetros bioquímicos séricos após intervenção. Ratos Wistar machos (60 dias de idade) foram divididos aleatoriamente em dois grupos: o grupo controle (n=9) cuja ração fornecida foi desenvolvida de acordo com a AIN-93M, com consumo *ad libitum* e o grupo que teve restrição calórica progressiva de 30% (n=9) em relação a média de consumo semanal do grupo controle. A intervenção durou 12 semanas, sendo os testes comportamentais realizados na 12ª semana. As análises bioquímicas séricas foram realizadas após a eutanásia. Ao longo das 12 semanas de intervenção dietética, o grupo RC apresentou ganho de peso corporal 21% inferior em relação ao grupo controle. Referente à análise comportamental, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre ambos os grupos na atividade locomotora, comportamento tipo ansioso e memória. A RC não causou desnutrição e houve redução significativa dos triglicerídeos em relação ao controle. Esses achados sugerem que a RC, com a suplementação adequada de micronutrientes, reduz o peso corporal ao final da intervenção, porém, não causa desnutrição e prejuízo na memória, comportamento tipo ansioso e função motora nos animais, sugerindo, possíveis efeitos regulatórios e compensatórios perante a redução do consumo alimentar.

**Palavras-chave:** Restrição calórica. Comportamento. Atividade locomotora. Comportamento tipo ansioso. Memória. Estado nutricional.

## INTRODUÇÃO

A dieta é um potente fator ambiental capaz de modular diversas funções metabólicas, celulares, inflamatórias e cerebrais. Estudos experimentais animais e epidemiológicos demonstraram que a exposição a padrões alimentares como o ocidental, por exemplo, são capazes de modular algumas destas funções prejudicialmente, como induzir a obesidade e contribuir para o aparecimento de disfunções cognitivas em longo prazo [1,2]. De encontro a esta prática, é sugerida a restrição calórica (RC), regime dietético definido como uma redução na quantidade diária total de alimentos com ausência de desnutrição, ou seja, é uma limitação da ingestão alimentar abaixo do nível *ad libitum* sem redução desproporcionada de um componente da dieta e sem comprometimento da adequação de micronutrientes.

Estudos demonstram que a RC foi capaz de estender a vida de roedores [3], aumentar a expressão de enzimas antioxidantes, elevar a biogênese mitocondrial [4], aumentar a expressão gênica de proteínas de resistência ao estresse [2], estimular a plasticidade sináptica, fatores neurotróficos e neurogênese [5–7], fatores que em conjunto podem levar a resistência ao déficit cognitivo e às alterações comportamentais [8]. Entretanto, são escassos os trabalhos na literatura científica que descrevem os efeitos da RC em modelos animais com ausência de algum prejuízo cognitivo, como modelos animais da doença de Parkinson e doença de Alzheimer. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é investigar o efeito da RC em parâmetros comportamentais durante a fase adulta de ratos saudáveis e avaliar o efeito deste protocolo dietético sobre parâmetros relacionados com o estado nutricional dos animais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais e dieta

Foram utilizados ratos Wistar machos (n=18) de 60 dias (peso 194-249g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), os quais foram mantidos em condições de luz e temperatura controladas ( $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), ciclo claro-escuro de doze horas (07:00-19:00), acesso à água *ad libitum*, acondicionados três animais



por caixa e pesados semanalmente. Todos os procedimentos seguiram as normas apresentadas no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH) e foram submetidos à apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) vinculada à Pró-Reitoria de Pesquisa da UFSC.

O tratamento dietético teve duração de doze semanas e os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos: dieta controle (C) e restrição calórica (RC). As dietas foram baseadas na composição do modelo AIN93 [9] com modificação de alguns ingredientes. A proteína isolada de soja substituiu a caseína e, para garantir as necessidades proteicas, em virtude de a proteína ser de origem vegetal, a proporção da proteína isolada de soja foi 25%, porcentagem semelhante a estudos prévios [10,11]. Também foi adicionada L-metionina com a finalidade de complementar a composição de aminoácidos essenciais, o amido dextrinizado foi retirado e a proporção do mesmo foi acrescentada à proporção de amido de milho, cujo cálculo correspondeu a diferença percentual para completar 100%, ou 100g da ração (Tabela 1).

**Tabela 1:** Composição centesimal das dietas Ce RC

INGREDIENTES	CONTROLE	RC <sup>#</sup>
Amido de milho	51	51
Proteína de soja isolada <sup>a</sup>	25	25
Sacarose	10	10
Óleo de soja	4	4
Fibra (celulose microfina) <sup>b</sup>	5	5
Mistura de minerais <sup>c</sup>	3,5	4,55
Mistura de vitaminas <sup>c</sup>	1	1,3
L-cistina <sup>d</sup>	0,18	0,234
L-metionina <sup>d</sup>	0,18	0,234
Bitartarato de colina <sup>d</sup>	0,25	0,325
Tetrabutyl-hidroquinona <sup>d</sup>	0,0008	0,00104

# Considerando RC de 30%, portanto, incremento de 30% dos micronutrientes

(a) Proteína de soja isolada (ISP.SUPRO 783, TovaniBenzaken, Brasil)

(b) Celulose microfina (Rhoster, Brasil)

(c) Mix de vitaminas e minerais AIN-93 (Rohster, Brasil)

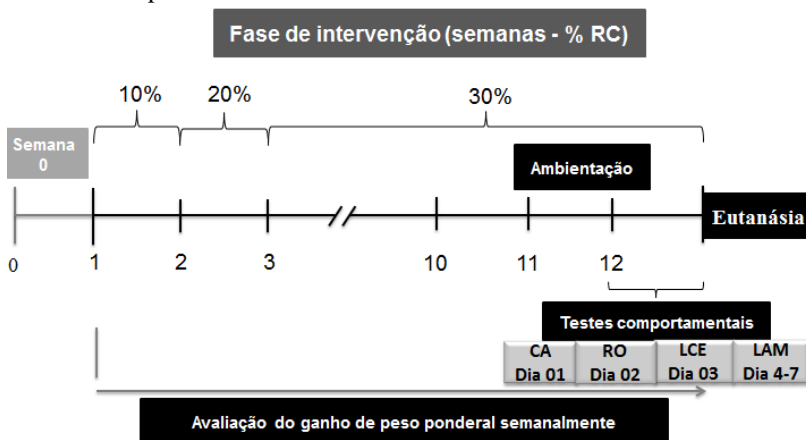
(d) L-cistina, L-metionina, bitartarato de colina e tetrabutyl-hidroquinona (Rhoster, Brasil)

A proporção tanto de metionina quanto de cistina foi baseada em estudo de Byington e Howe [12]. Houve controle diário do consumo da

quantidade de ração e, a partir disso calculada a média de ingestão calórica semanal.

O grupo RC recebeu 30% menos ração do que o consumido pelos animais do grupo C (Figura 1). O protocolo de RC foi aplicado de forma progressiva, iniciando com restrição de 10% do peso da ração fresca na primeira semana, 20% na semana seguinte e 30% no restante do experimento, tendo como base a média de consumo semanal do grupo controle. Para garantir que a restrição fosse apenas calórica com a adequação de micronutrientes, foi acrescentado, o mesmo percentual de vitaminas e minerais, de acordo com a progressão da restrição.

**Figura 1:** Fluxograma do estudo contendo a evolução da porcentagem de RC e os testes comportamentais realizados.



Legenda: CA: campo aberto; RO: reconhecimento de objeto; LCE: labirinto em cruz elevado; LAM: labirinto aquático de Morris.

Após as doze semanas de intervenção, os animais foram submetidos aos testes comportamentais e ao teste de tolerância à glicose (TTG). Após esses processos, foram anestesiados com cetamina (100ml/kg intraperitoneal) e xilazina (10ml/kg intraperitoneal) para realização da punção cardíaca para obtenção do sangue para análises bioquímicas e foram eutanasiados pelo método físico de decapitação para coleta dos materiais biológicos.

## **2.2 Testes comportamentais**

Após doze semanas de tratamento dietético, os animais foram submetidos à bateria de testes comportamentais, realizados em dias consecutivos e durante o período matutino. A avaliação foi feita na seguinte ordem: atividade locomotora por meio do teste do campo aberto (CA); avaliação do comportamento tipo ansioso, por meio do teste do labirinto em cruz elevado (LCE); avaliação da memória de curto prazo por meio do teste do reconhecimento de objeto (RO) e da memória espacial pelo teste do labirinto aquático de Morris (LAM). Para todos os testes foi utilizada luz de baixa intensidade de 12 lux.

Todos os testes foram filmados por uma câmera posicionada acima dos aparatos e analisadas no *software* Any Maze (Stoelting, Co., Wood Dale, IL, USA).

### **2.2.1 Campo aberto**

O teste campo aberto foi aplicada para avaliação da atividade locomotora dos animais e baseou-se em estudo prévio [13]. O animal foi posicionado no centro de uma arena (100cm x 100cm/25 quadrados de 20cm x 20 cm) e durante 15 minutos foi permitida a exploração espontânea do aparato. Após cada sessão, o aparato foi limpo com álcool 10%.

As variáveis utilizadas para a análise da atividade locomotora exploratória foram: distância total percorrida, tempo gasto nas zonas central e periférica e o número de entradas em ambas as áreas. Para análise da atividade vertical foi analisado o número de episódios de *rearings*.

### **2.2.2 Teste do reconhecimento de objeto**

O teste de reconhecimento do objeto foi baseado no protocolo descrito por Bevins & Besheer [14], com uso de três objetos (dois familiares e um novo objeto) para análise da memória de curto prazo. Os objetos familiares eram pequenas garrafas plásticas e o objeto novo uma lata de alumínio. Foi utilizado o mesmo aparelho empregado no teste do campo aberto e consistiu em três fases distintas: a habituação, amostra e discriminação. A fase de habituação consistiu na exploração do ambiente (aparato do campo aberto) pelos animais durante quinze minutos, um dia prévio ao teste.

Na fase de amostra, 24 horas depois da habituação, foram colocados dois objetos idênticos, posicionados em cantos opostos do aparato, com cinco minutos de exploração livre. Previamente a fase de discriminação, os animais permaneceram em suas caixas por um período de 30 minutos. Durante a fase de discriminação, foram utilizados um objeto familiar e um objeto novo, para exploração durante 5 minutos. A localização do novo objeto novo foi aleatoriamente permutada a cada sessão com os animais.

A exploração de um objeto foi definida como o momento no qual o animal dirigiu o focinho para o objeto a uma distância menor a 2 cm e/ou tocou-o com o focinho. A cada sessão dos animais, o aparelho e os objetos utilizados no teste foram limpos com álcool 10%.

Para análise foi considerado o tempo de exploração dos objetos durante as fases de amostra e discriminação e o índice de discriminação, calculado pela razão entre o tempo de exploração do objeto novo e a somatória da exploração do objeto novo e do objeto familiar, sendo a razão posteriormente multiplicada por 100.

### ***2.2.3 Labirinto em cruz elevado***

O teste do labirinto em cruz elevado foi utilizado para avaliação do comportamento tipo-ansioso dos animais, conforme protocolo descrito previamente [15]. O aparato possui dois braços fechados (50cmx10cmx40cm) e dois abertos (50cmx10cm) no qual cada animal, ao início do teste, foi colocado na junção dos braços, voltado para o braço fechado e foi temporizado 5 minutos para exploração do aparato. A entrada do animal em um dos braços foi considerada quando pelo menos duas patas estivessem dentro de um dos braços e a saída considerada quando as quatro patas deixassem um dos braços. Ao término de cada sessão, o labirinto foi limpo com álcool 10%.

Foi analisado o número de entrada em ambos os braços, bem como, o tempo que o animal permaneceu em cada um deles. O dado foi representado pela porcentagem de tempo nos braços abertos e fechados, descontando o tempo de permanência do animal da região central do aparato.

### ***2.2.4 Labirinto aquático de Morris***

O labirinto aquático de Morris foi utilizado para avaliação da memória espacial dos animais, ligada principalmente à região encefálica

hipocampal [16]. O protocolo aplicado foi baseado em estudos anteriores [17,18], cuja duração correspondeu a quatro dias, sendo três deles de treino e o último dia de teste, no qual a plataforma foi retirada.

Uma piscina redonda, fabricada com material plástico, com diâmetro de 1,60m e 82cm de altura, foi dividida em quatro quadrantes representados pelos pontos cardiais (norte, sul, leste e oeste), sendo a plataforma localizada na posição noroeste, cujas dimensões corresponderam a 10cmx13cm. A piscina foi cheia com água até a altura de 54 cm e a plataforma foi submergida a 1cm.

Cada período de treinamento consistiu em quatro ensaios, com duração de 60 segundos cada, nos quais os animais eram aleatoriamente posicionados nos quadrantes. A ordem aleatória de início foi seguida para todos os animais. O objetivo dos treinos era que o animal encontrasse a plataforma e nela permanecesse por 10 segundos, caso não a encontrasse, o animal era gentilmente conduzido até a mesma. Após cada ensaio dos treinos, foi dado intervalo de 20 segundos, no qual o animal era acondicionado provisória e individualmente em uma caixa. Durante os dias de treinos, foi analisada a latência de escape.

No quarto dia, o dia de treino, a plataforma foi retirada e os animais nadaram durante 60 segundos. Foram analisadas as variáveis: velocidade média, distância total percorrida, número de entradas no alvo (que seria a plataforma), tempo na zona da plataforma e latência para primeira entrada no alvo.

### **2.3 Teste de tolerância à glicose (TTG)**

Após o término dos testes comportamentais, os animais foram submetidos ao TTG. Os animais foram mantidos em jejum prévio (15 horas) para mensurar a glicemia, utilizando o sangue da cauda e um glicosímetro (Accu-Check Performa, São Paulo, Brasil). Após, foi aplicada injeção intraperitoneal contendo solução de dextrose (4g/kg peso em solução salina) e retirada as amostras sanguíneas para os três posteriores momentos (30, 60 e 120 min após a injeção). O valor de dextrose por peso do animal, bem como o tempo de jejum foi definido após padronização prévia no laboratório (dados não mostrados).

A partir das aferições glicêmicas, foi construída a curva de tolerância à glicose.

## **2.4 Análises bioquímicas**

### **2.4.1 Análise do soro**

As análises bioquímicas dos parâmetros bioquímicos sanguíneos do estado nutricional (proteína total, albumina, triglicerídeos, colesterol total, creatinina, AST, ALT e ureia) foram realizadas utilizando kits comerciais (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais) e as análises bioquímicas foram realizadas em equipamento automatizado Cobas Mira Plus (Roche Diagnósticos, Basel, Suíça).

### **2.4.2 Dosagem de proteínas**

As proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford [19] utilizando albumina bovina como padrão. Alíquotas de amostra (50 $\mu$ L) foram adicionadas a 2,0mL do reagente de trabalho (Coomassie Blue) e mantidas em ambiente escuro por 5 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em 595 nm no equipamento espectrofotômetro.

## **2.5 Pesagem das estruturas corporais**

Após o final do experimento, os animais foram anestesiados (cetamina 100mg/kg e xilazina 10mg/kg), eutanasiados por decapitação e posteriormente, retiradas e pesadas as estruturas corporais: fígado, tecido adiposo epididimal e retroperitônio para comparação de massa das estruturas entre os grupos.

## **ESTATÍSTICA**

A análise estatística foi realizada por meio do programa estatístico Statistica versão 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) e os gráficos foram desenvolvidos no *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

Para análise da normalidade dos dados foi aplicado o teste Shapiro-Wilk, os dados que apresentaram simetria foram expressos na forma de média e erro padrão da média e, quando assimétricos, foram expressos como mediana e intervalo interquartil. Para analisar as diferenças de médias entre ambos os grupos nas variáveis bioquímicas, pesos dos tecidos corporais e nos testes comportamentais foi aplicado o teste-t de Student. Para análise do peso dos animais ao longo do

experimento, teste de tolerância à glicose e dias de treino no MWW foi utilizado ANOVA de medidas repetidas e se encontrada diferença, foi aplicado o *post hoc* Bonferroni. Para todos os testes estatísticos realizados foi adotado o nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

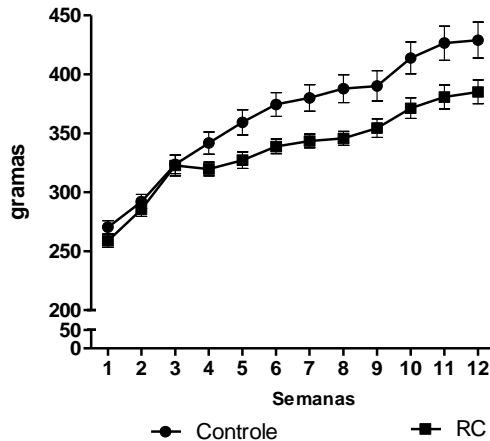
### *4.1 Efeitos da RC no peso corporal e estado nutricional dos animais*

A média do peso inicial de ambos os grupos foi semelhante no início do experimento. A evolução ponderal semanal da média de peso dos grupos não apresentou diferença estatística ao longo das semanas de intervenção (figura 2A), entretanto a variação do peso corporal inicial e final (figura 2B) dos animais durante as semanas de intervenção apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,034$ ). O ganho de peso durante as doze semanas intervencionais correspondeu a 159g ( $EP \pm 10,40$ ) no grupo controle, enquanto no grupo RC foi de 126g ( $EP \pm 9,36$ ). A média final do peso do grupo RC (385g/ $EP \pm 10,07$ ) foi 10,25% inferior ao do grupo controle (420g/ $EP \pm 15,23$ ) ao final das doze semanas de intervenção dietética ( $p = 0,028$ ). A média de peso corporal ao final da intervenção é mostrada na figura 3, com um animal representante de cada grupo experimental.

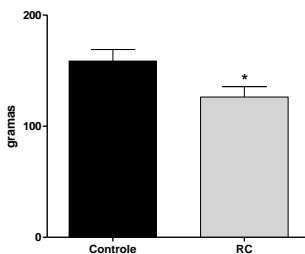
A evolução da RC ao longo das semanas de intervenção acompanhou proporcionalmente o consumo por animal do grupo controle, sendo a evolução representada na figura 2C. O consumo do grupo RC durante a primeira semana correspondeu a 90% do consumo de ração do grupo controle, 80% na segunda semana e 70% da terceira semana ao final do experimento. Essa forma de evolução da restrição ao longo das semanas, sempre acompanhando o consumo do grupo controle, garantiu que a RC fosse proporcional a evolução do consumo dos animais ao longo de seu crescimento e envelhecimento. Dessa forma, a RC foi de acordo com a porcentagem almejada e não superior a ela, sendo sempre utilizada a média de consumo semanal do grupo controle para o cálculo da semana seguinte do consumo do grupo RC.

**Figura 2: Evolução do peso e consumo dos animais ao longo das 12 semanas de intervenção dietética. (A) Evolução ponderal semanal do pesos dos animais controle e RC. (B) Variação do peso corporal dos animais ao longo do experimento (peso inicial - peso final) (C) Média do consumo alimentar semanal por animal.**

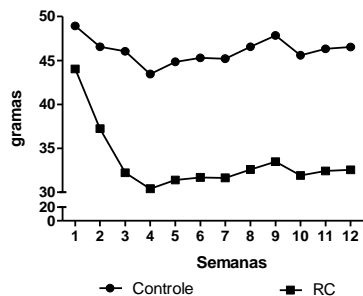
**A**



**B**



**C**



Dados apresentados como média±EPM, N por grupo=9.



**Figura 3:** Animais representantes da média corporal dos grupos controle (à esquerda) e RC (à direita) ao final do experimento



A comparação do peso entre as estruturas corporais nos dois grupos não apresentou diferença estatística, apesar de o peso do fígado que apresentou tendência de redução de peso do grupo RC em relação ao controle ( $p=0,059$ ). A razão entre o tecido adiposo total (somatória do tecido adiposo retroperitoneal e tecido adiposo epididimal pelo peso corporal) não diferiu estatisticamente (tabela 02).

**Tabela 2:** Peso das estruturas em gramas.

Estrutura (g)	Controle	RC	p-valor
Fígado	11,97±0,48	10,51±0,53	0,059
Tec. adiposo retroperitoneal (R)	8,44±1,48	9,39±0,97	0,597
Tec. adiposo epididimal (E)	1,54±0,13	1,48±0,17	0,778
Tec. adiposo total (R+E)/peso corporal	0,023±0,004	0,028±0,003	0,273

Dados representados por média±EPM, N por grupo=9 animais.

Quanto aos parâmetros bioquímicos sanguíneos (tabela 3), a função renal dos animais analisada pelas variáveis creatinina e ureia apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. A creatinina do grupo RC apresentou-se 23% superior ao grupo controle ( $p=0,03$ ) e a ureia do grupo RC apresentou redução de aproximadamente 19% em relação ao grupo controle ( $p=0,006$ ). Porém, apesar desta diferença, os valores mensurados ainda estavam dentro da normalidade para estes parâmetros.

Os triglicerídeos séricos do grupo RC apresentaram decréscimo estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ( $p=0,013$ ), sendo a mediana do grupo RC igual a 47/dL (IQ 36-53) e a do grupo controle 67mg/dL (IQ 60-103).

As concentrações séricas das enzimas hepáticas AST (Aspartato transaminase) e ALT (Alanina aminotransferase), bem como das concentrações de albumina, proteínas totais e glicemia de jejum não diferiram estatisticamente entre os grupos.

**Tabela 3:** Variáveis bioquímicas dos grupos controle e restrição calórica

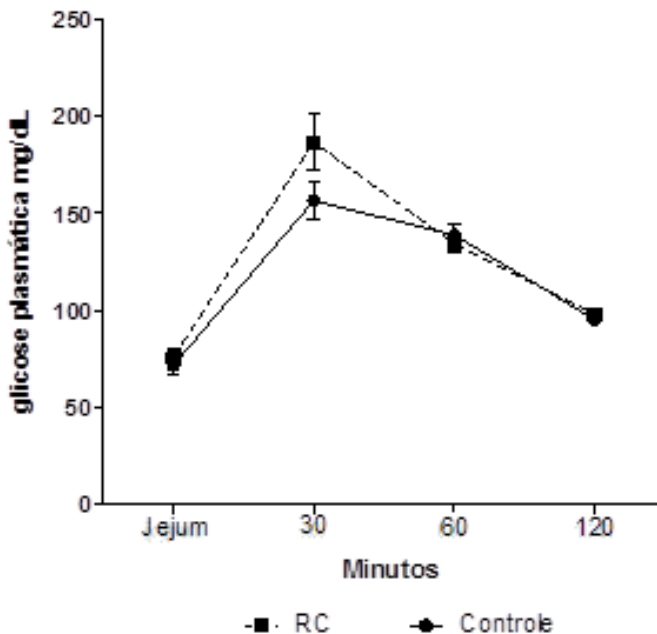
Variáveis (mg/dL)	Controle	RC	p-valor
Creatinina	0,40±0,02	0,49±0,04	0,030
Albumina	2,83±0,08	2,87±0,16	0,854
Ureia	41,70±1,86	33,82±1,68	0,006
AST	82,75±5,78	89,38±9,91	0,595
ALT	29,11±4,65	37,71±7,01	0,342
Glicose	194,11±12,92	204,56±9,77	0,528
Colesterol	99,44±10,01	110,44±8,06	0,405
Triglicerídeos*	67,00 (60-103)	47,00 (36-53)	0,013
Proteínas totais	6,97±0,13	6,94±0,11	0,875

Dados representadas por média±EPM. N por grupo=9.

\*Os valores de triglicerídeos são expressos por mediana e intervalo interquartil.

De acordo com ANOVA de medidas repetidas, não houve interação entre os tempos de aferição e a glicose plasmática de ambos os grupos ( $p>0,05$ ) durante teste de tolerância à glicose (figura 4).

**Figura 4:** Teste de tolerância à glicose do grupo controle e RC, a área sob a curva (AUC) não diferiram estatisticamente entre os grupos sendo AUC controle correspondente a 378,5 e AUC RC igual a 407,3.



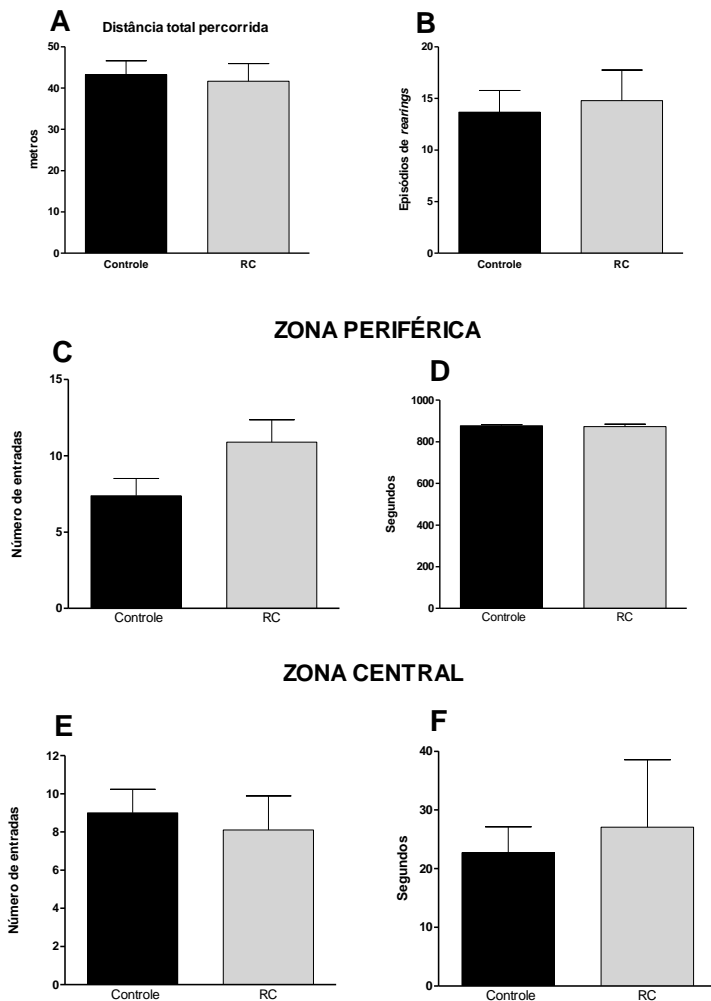
Os valores são representados por média±EPM e n por grupo=9 animais

#### **4.2 Efeitos da RC sobre os parâmetros comportamentais**

As variáveis relacionadas à atividade locomotora exploratória dos animais, analisadas pelo teste do campo aberto, não diferiram estatisticamente entre os grupos, mostrando que a RC não causou prejuízo neste quesito. A distância total percorrida (figura 5A), assim como o parâmetro de atividade vertical representado pelos episódios de

*rearings* (figura 5B) durante os 15 minutos de teste não diferiram entre os grupos. O número de entradas e o tempo na zona periférica (figura 5C e D), bem como o número de entradas e o tempo na zona central foram similares entre os grupos (figura 5E e F).

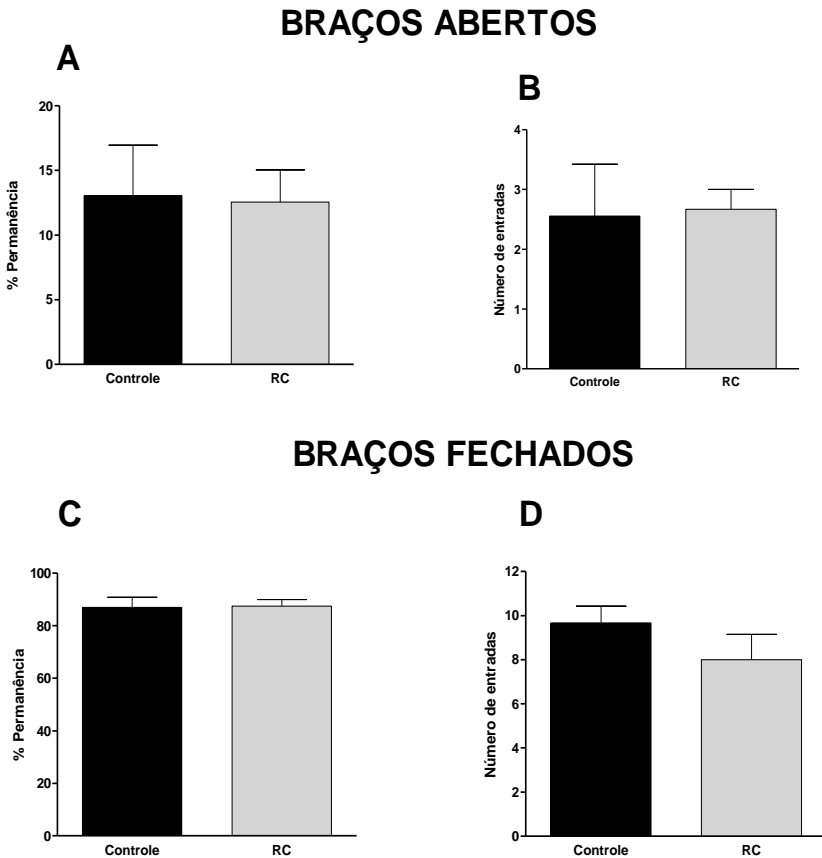
**Figura 5: Atividade locomotora avaliada pelo teste do campo aberto foi similar em ambos os grupos durante os quinze minutos de teste (A) Distância total percorrida em metros. (B) Episódios de *rearings* – atividade exploratória vertical. (C) Número de entradas pelos animais na zona periférica. (D) Tempo de exploração em segundos na zona periférica. (E) Número de entradas pelos animais na zona central. (F) Tempo de exploração em segundos na zona central.**



Dados representados por média±EPM, n=9 por grupo.

O comportamento tipo-ansioso dos animais, avaliado por meio do teste do labirinto em cruz elevado, não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, ou seja, nenhum dos parâmetros avaliados foi afetado negativamente pela RC (figura 6).

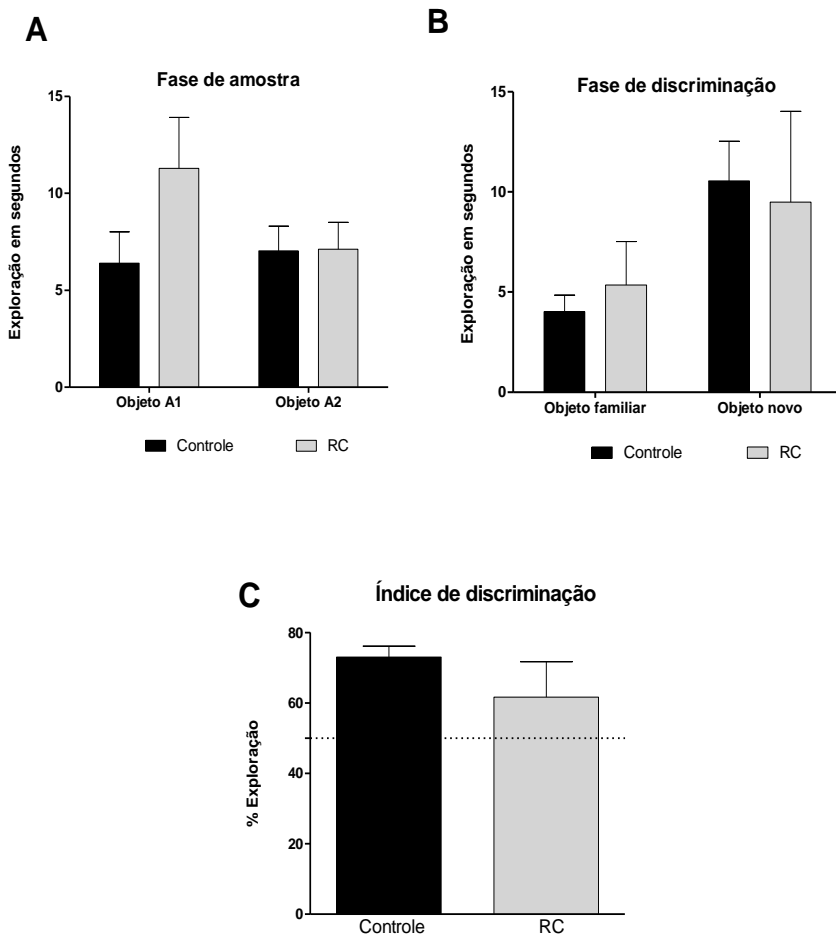
**Figura 6: Labirinto em cruz elevado - As variáveis analisadas foram similares entre os grupos (A) Porcentagem de tempo de permanência dos animais nos braços abertos. (B) Número de entradas dos animais nos braços abertos. (C) Porcentagem de tempo de permanência dos animais nos braços fechados. (D) Número de entradas dos animais nos braços fechados**



Dados representados por média±EPM, n=9 por grupo.

Para avaliação da memória, os animais foram submetidos aos testes de reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris. O comportamento dos animais durante o teste do reconhecimento de objeto, para análise da memória de curto prazo e reconhecimento, obteve resultados semelhantes estatisticamente entre os grupos. Durante a fase de amostra, os dois grupos intervencionais obtiveram média de tempo de exploração dos objetos familiares similares (figura 7A). Durante a fase de discriminação foi igualmente observada semelhança entre a média de exploração do objeto familiar e objeto novo em ambos os grupos (figura 7B). Os resultados observados no índice de discriminação também não diferiram entre os grupos (figura 7C).

**Figura 07: Teste do reconhecimento de objetos - Similaridade nas variáveis ligadas à memória de curto prazo entre os grupos (A) Tempo de exploração em segundos de ambos os objetos familiares durante a fase de amostra. (B) Tempo de exploração em segundos do objeto familiar e objeto novo durante a fase de discriminação. (C) Índice de discriminação dos animais durante a fase de discriminação. A linha tracejada indica exploração superior a 50%.**



Dados representados por média±EPM, n=9 por grupo.

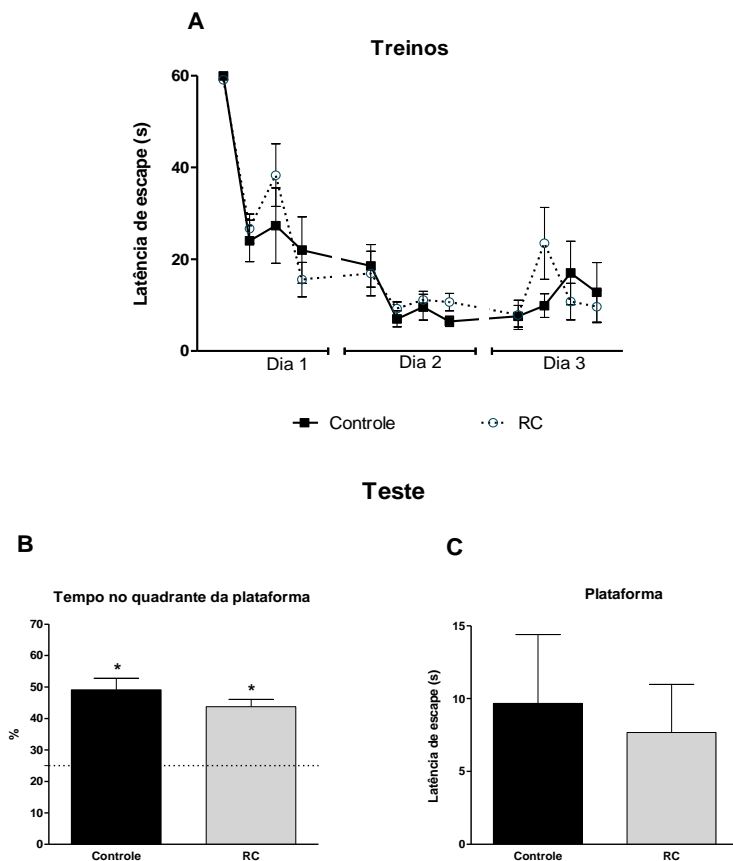
Em relação à memória espacial, avaliada por meio do labirinto aquático de Morris, não houve diferença entre os grupos. Durante os três



dias de treino, os animais apresentaram valores de latência de escape similares (figura 8A). Apesar da redução significativa entre a latência de escape com o passar dos dias de treino (o que é esperado para este teste), não houve diferenças entre os grupos quanto ao tempo e latência para chegar à plataforma.

No dia do teste, a distância total percorrida, a velocidade média e o número de entradas no local em que a plataforma estaria foram similares entre os grupos. A porcentagem de permanência no quadrante da plataforma não apresentou diferença estatística entre os grupos (figura 8B), entretanto, em ambos os grupos, a variável foi estatisticamente superior a porcentagem mínima esperada de permanência equivalente a 25%, ou 15 segundos (representada pela linha tracejada na figura 8B). Por fim, a latência de escape para a primeira entrada na plataforma (figura 8C) foi similar entre os grupos.

**Figura 08: Desempenho dos animais durante o labirinto aquático de Morris.** (A) Média da latência de escape em segundos para encontrar a plataforma durante os quatro *trials* e os três dias de treino. Por meio do ANOVA de mediadas repetidas foi verificada interação intragrupo entre o primeiro dia e o segundo de teste e a redução do tempo para encontrar a plataforma, entretanto, não houve diferença entre os grupos e os dias de treino. (B) Porcentagem de tempo no quadrante da plataforma durante o teste. Ambos os grupos permaneceram mais que 25% do tempo no quadrante da plataforma. (C) Latência de escape em segundos para primeira entrada na plataforma durante o teste.



\* Porcentagem média de permanência no quadrante da plataforma estatisticamente superior a 25% em ambos os grupos. Dados representados por média±EPM, n=9 por grupo.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no trabalho mostraram que o protocolo de RC de 30% não causou desnutrição nos animais, bem como não gerou prejuízos motor e comportamental (comportamento tipo ansioso e memória), sugerindo ser segura a manutenção da restrição calórica durante as 12 semanas de intervenção. Concomitante a esses resultados, e similar aos estudos em modelos murinos que foram submetidos à RC (com suplementação de micronutrientes), os animais do grupo RC não apresentaram perda de peso, mas sim, ganho de peso semanal ponderal retardado, ou seja, abaixo do grupo controle, mas ainda assim, adequado ao desenvolvimento natural do animal [20–23].

Desde o estudo pioneiro de McCay [3], a RC é definida como um protocolo de restrição de calorias, sem comprometimento da oferta de micronutrientes, ou seja, subnutrição sem desnutrição [24]. No entanto, foi verificada dificuldades em classificar os protocolos como RC, visto que em muitos estudos não houve detalhamento metodológico e descrição de procedimentos inerentes ao protocolo. Dentre essas descrições, são destacadas a suplementação de micronutrientes, composição da dieta, restrição calórica baseada no consumo do grupo controle, duração da intervenção ou restrição calórica acompanhando o crescimento e consumo do animal. Conseqüentemente, a discussão e comparação dos resultados de estudos publicados sobre a temática tornam-se obstada, por isso, sugerimos a padronização do protocolo dietético e descrição detalhada do modelo intervencional para possível comparação de resultados. Além disso, foi constatada a carência de estudos que tenham avaliado o efeito da restrição calórica em modelos animais com ausência de prejuízos cognitivos ou indução de algum modelo de doença. Por isso, é sugerido que o protocolo de RC seja seguido, para que dessa forma, possa haver uma padronização das intervenções dietéticas ligadas à restrição calórica.

É destacada a importância da garantia do aporte de micronutrientes dos animais em RC por meio da suplementação dos mesmos. As vitaminas e minerais atuam em diversas funções cerebrais e são cruciais para o funcionamento fisiológico cerebral normal. Dentre as funções dos micronutrientes destacam-se a ação antioxidante, ação neuroprotetora, ação contra a excitotoxicidade e ação antiinflamatória [25,26].

Em relação às variáveis bioquímicas séricas, foi observada ausência de desnutrição nos animais submetidos à RC. Tanto o grupo RC quanto o grupo controle obtiveram valores bioquímicos séricos

dentro da faixa de normalidade dos valores de referência para ratos Wistar machos [27]. Entretanto, foi observada redução significativa dos triglicérides séricos no grupo RC, fato que pode ser atribuído pela regulação negativa da lipogênese e ativação da gliconeogênese e da lipólise durante a RC. Contrariamente a estudos prévios, encontramos valores similares de glicose entre os grupos, o que pode ser justificado pela palatabilidade e composição centesimal da dieta, curto tempo de duração intervencional e a porcentagem de RC.

Em nosso estudo não foi observado prejuízo comportamental em relação à atividade locomotora, comportamento tipo ansioso e na função de memória dos animais submetidos à RC de 30% por 12 semanas. Os parâmetros comportamentais analisados, apesar de divergências apresentadas na literatura, foram similares com alguns estudos publicados. A atividade locomotora exploratória testada no campo aberto do grupo RC não diferiu do controle, assim como em estudos prévios [20,28,29]. Contudo, em animais submetidos aos modelos de neurodegeneração, ocorre a melhora das variáveis analisadas no campo aberto em relação ao grupo controle [20,30]. Já em outro estudo cuja porcentagem de RC correspondeu a 30% durante quinze semanas [31], o comportamento exploratório foi maior no grupo controle, podendo indicar prejuízo aos animais quando submetidos ao protocolo dietético de RC, além do fato de não ter havido a suplementação dos micronutrientes. Riddle e colaboradores [32] analisaram a memória dos animais por meio do teste de reconhecimento de objetos e não encontraram distinção na exploração dos objetos em animais submetidos a 40% de RC, enquanto que, em um modelo de neurodegeneração (camundongo duplo de deleção gênica para CK-p25), houve significativo incremento no índice de discriminação no grupo RC em relação ao grupo *ad libitum* [30]. Referente ao desempenho do grupo RC no labirinto aquático de Morris, foram encontrados valores similares aos nossos na literatura, tanto no tempo no quadrante da plataforma quanto na velocidade média [21,28,33,34]. Observando o conjunto de resultados da literatura científica com diferentes protocolos de RC, é possível afirmar que a RC tem efeitos comportamentais positivos quando os animais são submetidos a algum modelo de neurodegeneração, ou seja, já há prejuízo comportamental previamente induzido. O nosso estudo buscou verificar quais seriam as consequências comportamentais referentes ao protocolo de 30% de RC, sua segurança e, principalmente, seus efeitos independentemente de algum dano específico.

Apesar de estudos descreverem que a RC pode levar a um comportamento tipo-ansioso em relação ao grupo controle [28,31,35] e depressão [36], contudo, as porcentagens de RC aplicadas para obtenção destes resultados foram superiores a 30%, chegando a 50%, além disso, não foi realizada progressivamente e não houve suplementação de micronutrientes. Contrariamente, em nosso estudo os animais do grupo RC não diferiram tanto na comportamento tipo ansioso (analisada pelos testes do campo aberto e pelo labirinto em cruz elevado), quanto na depressão, verificado por meio do teste do nado forçado (dados não mostrados). Esses achados são muito importantes, pois sugerem ausência de prejuízos emocionais ligados à redução da ingestão alimentar.

É especulada na literatura que essas mudanças nos parâmetros comportamentais podem ser oriundas da reprogramação cerebral mediada pela RC. A memória e aprendizagem inalterada pode ser resultado da redução da ativação de astrócitos e ativação da autofagia hipocampal [33], bem como preservação neuronal hipocampal [20], aumento da expressão da sirtuína-1 [37], estimulação da neurogênese hipocampal adulta, da plasticidade sináptica e biogênese mitocondrial [8,35,38], os quais não foram investigados em nosso estudo. Além disso, alterações metabólicas relacionadas à redução do consumo alimentar podem implicar em alterações comportamentais, visto que, durante a RC, ocorre reprogramação metabólica de forma a garantir combustível energético, o que poderia justificar a similaridade com o controle em relação ao comportamento tipo ansioso e a redução dos triglicerídeos séricos. Em um modelo de restrição calórica de 30% durante cinco semanas, houve incremento de aproximadamente quatro vezes na oxidação lipídica no grupo RC em relação ao grupo controle [8], fato que, além da garantia de combustível energético, poderia justificar a redução da ansiedade no momento de privação alimentar.

Alguns dos estudos relativos aos efeitos da RC visam estudar a sua influência sobre o processo de envelhecimento e longevidade. Segundo a Organização das Nações Unidas [39] a população idosa mundial quadruplicará até 2050 e, com isso, passará a apresentar alterações cognitivas e comportamentais inerentes ao processo senil. Concomitante a evolução deste processo, tem ocorrido extensiva incorporação de práticas alimentares não salutaras, como a dieta ocidentalizada, baseada em alimentos ultraprocessados e hipercalóricos. Evidências sugerem o efeito deletério dessas práticas alimentares no processo de envelhecimento devido à ingestão excessiva de energia associada ao estilo de vida sedentário, colocando o cérebro em risco

para o desenvolvimento de disfunções cognitivas no envelhecimento e também neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer [1,2,40,41]. A dieta tem um papel importante para a saúde mental, não só durante o desenvolvimento do organismo, mas também durante a fase adulta, além disso, pode influenciar nas capacidades de aprendizagem, memória e humor [35]. Por essa razão, o presente estudo surge como uma proposta de aplicação do protocolo de restrição calórica iniciada na fase adulta e aplicada como profilaxia ou amenização de possíveis prejuízos senis, sendo destacada a manutenção do estado nutricional dos animais, concomitante a preservação das atividades comportamentais (memória e ansiedade) e atividade motora, o que ampara a aplicação deste protocolo de forma segura quanto ao parâmetro comportamental e cognitivo.

Existiram certamente limitações no estudo, sendo destacada a ausência de mensuração alimentar individual dos animais, pelo fato da opção pelo acondicionamento em caixas com três animais. Devido ao desfecho analisado ser diretamente influenciado pelo isolamento social, optou-se por mantê-los em pequenos grupos. O isolamento é um fator estressante e pode tornar-se um importante modulador negativo de neurogênese hipocampal adulta que, por conseguinte, pode levar ao comportamento depressivo do animal [15,35].

Nosso estudo mostrou que este é um protocolo sem prejuízos de ordem nutricional e comportamental, de forma a ser utilizado de maneira crônica em futuros estudos experimentais animais, que busquem esclarecer os efeitos da RC sobre o envelhecimento e longevidade, por respeitar o desenvolvimento ponderal natural do animal. Também, com este protocolo, é possível desenvolver futuros estudos que busquem evidenciar os efeitos terapêuticos da RC em diversos modelos de neurodegeneração, uma vez que já foi mostrado neste estudo a ausência de prejuízos comportamentais nos animais, a fim de uniformizar os achados da literatura em termos de protocolo dietético.

Por fim, o protocolo aplicado de RC de 30% de forma progressiva e suplementação de micronutrientes não causou desnutrição e alterações comportamentais nos animais, com isso, é sugerida a implantação deste protocolo nos estudos relacionados à RC e seus efeitos em diversos parâmetros. Assim, será possível realizar comparações entre estudos nesta temática, visto que o rigor metodológico da intervenção dietética será aplicado em todos os estudos. Além disso, o estudo contribui como pesquisa de base, essenciais para futuras aplicações da intervenção dietética. Apesar dos

achados, mais estudos são necessários para que se possa compreender e analisar os efeitos em outros parâmetros mediados pela RC.

## REFERÊNCIAS

- [1] Francis H, Stevenson R. The longer-term impacts of Western diet on human cognition and the brain. *Appetite* 2013;63:119–28. doi:10.1016/j.appet.2012.12.018.
- [2] Kanoski SE, Davidson TL. Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol Behav* 2011;103:59–68. doi:10.1016/j.physbeh.2010.12.003.
- [3] McCAY C. M., CROWELL M. F., MAYNARD L. A. Journal of Nutrition. Eff Retard Growth Length Life Span Ultim Body Size 1935;10:63–79.
- [4] Austin, Shane, St-Pierre, Julie. Journal of Cell Science. PGC1a Mitochondrial Metab – Emerg Concepts Relev Ageing Neurodegener Disord 2012;125:4963–71.
- [5] Sebben, Alessandra Deise, Cocolichio, Fernanda, Schmitt, Ana Paula Victor, Curra, Mariana Dias, Silva, Paloma Viegas da, Tres, Guilherme Leví, et al. Efeito de fatores neutotróficos sobre o reparo de nervo periférico. *Sci Medica* 2011;21:81–9.
- [6] Mattson MP. Energy intake, meal frequency, and health: a neurobiological perspective. *Annu Rev Nutr* 2005;25:237–60. doi:10.1146/annurev.nutr.25.050304.092526.
- [7] Contestabile A. Benefits of caloric restriction on brain aging and related pathological States: understanding mechanisms to devise novel therapies. *Curr Med Chem* 2009;16:350–61.
- [8] Bordone L, Guarente L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:298–305. doi:10.1038/nrm1616.
- [9] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad

hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123:1939–51.

[10] de Assis AM, Rech A, Longoni A, da Silva Morrone M, de Bittencourt Pasquali MA, Perry MLS, et al. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids revert renal responses induced by a combination of 2 protocols that increase the amounts of advanced glycation end product in rats. *Nutr Res N Y N* 2015;35:512–22. doi:10.1016/j.nutres.2015.04.013.

[11] de Assis AM, Rech A, Longoni A, Rotta LN, Denardin CC, Pasquali MA, et al.  $\Omega$ 3-Polyunsaturated fatty acids prevent lipoperoxidation, modulate antioxidant enzymes, and reduce lipid content but do not alter glycogen metabolism in the livers of diabetic rats fed on a high fat thermolyzed diet. *Mol Cell Biochem* 2012;361:151–60. doi:10.1007/s11010-011-1099-4.

[12] Byington MH, Howe JM. Effect of level and proportion of methionine and cystine on plasma amino acids of young rats. *J Nutr* 1972;102:995–1000.

[13] Matheus FC, Rial D, Real JI, Lemos C, Ben J, Guaita GO, et al. Decreased synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex underlies short-term memory deficits in 6-OHDA-lesioned rats. *Behav Brain Res* 2016;301:43–54. doi:10.1016/j.bbr.2015.12.011.

[14] Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study “recognition memory.” *Nat Protoc* 2006;1:1306–11. doi:10.1038/nprot.2006.205.

[15] Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2007;2:322–8. doi:10.1038/nprot.2007.44.

[16] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 2006;1:848–58. doi:10.1038/nprot.2006.116.

[17] Castro AA, Wiemes BP, Matheus FC, Lapa FR, Viola GG, Santos AR, et al. Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-



tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2013;1513:103–16. doi:10.1016/j.brainres.2013.03.029.

[18] Soares E, Prediger RD, Nunes S, Castro AA, Viana SD, Lemos C, et al. Spatial memory impairments in a prediabetic rat model. *Neuroscience* 2013;250:565–77. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.07.055.

[19] Dodd PR, Bradford HF. A superfusion system for long-term studies on cerebral cortex in vivo. *Biochem Soc Trans* 1976;4:13–9.

[20] Brownlow ML, Joly-Amado A, Azam S, Elza M, Selenica M-L, Pappas C, et al. Partial rescue of memory deficits induced by calorie restriction in a mouse model of tau deposition. *Behav Brain Res* 2014;271:79–88. doi:10.1016/j.bbr.2014.06.001.

[21] Yang F, Chu X, Yin M, Liu X, Yuan H, Niu Y, et al. mTOR and autophagy in normal brain aging and caloric restriction ameliorating age-related cognition deficits. *Behav Brain Res* 2014;264:82–90. doi:10.1016/j.bbr.2014.02.005.

[22] Harvey AE, Lashinger LM, Hays D, Harrison LM, Lewis K, Fischer SM, et al. Calorie Restriction Decreases Murine and Human Pancreatic Tumor Cell Growth, Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation, and Inflammation-Related Gene Expression in an Insulin-like Growth Factor-1-Dependent Manner. *PLOS ONE* 2014;9:e94151. doi:10.1371/journal.pone.0094151.

[23] Chen J-H, Ouyang C, Ding Q, Song J, Cao W, Mao L. A Moderate Low-Carbohydrate Low-Calorie Diet Improves Lipid Profile, Insulin Sensitivity and Adiponectin Expression in Rats. *Nutrients* 2015;7:4724–38. doi:10.3390/nu7064724.

[24] Cerqueira FM, Kowaltowski AJ. Commonly adopted caloric restriction protocols often involve malnutrition. *Ageing Res Rev* 2010;9:424–30. doi:10.1016/j.arr.2010.05.002.

[25] Littlejohns TJ, Henley WE, Lang IA, Annweiler C, Beauchet O, Chaves PHM, et al. Vitamin D and the risk of dementia and Alzheimer

disease. *Neurology* 2014;83:920–8.  
doi:10.1212/WNL.0000000000000755.

[26] Vonder Haar C, Peterson TC, Martens KM, Hoane MR. Vitamins and nutrients as primary treatments in experimental brain injury: Clinical implications for nutraceutical therapies. *Brain Res* 2016;1640, Part A:114–29. doi:10.1016/j.brainres.2015.12.030.

[27] MELO, DÓRIA G. A. A., SERAFINI M. R., ARAÚJO A. A. S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus novergicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. *Sci Plena* 2012;8:1–6.

[28] Kuhla A, Lange S, Holzmann C, Maass F, Petersen J, Vollmar B, et al. Lifelong caloric restriction increases working memory in mice. *PloS One* 2013;8:e68778. doi:10.1371/journal.pone.0068778.

[29] Wu A, Sun X, Liu Y. Effects of caloric restriction on cognition and behavior in developing mice. *Neurosci Lett* 2003;339:166–8. doi:10.1016/S0304-3940(03)00008-9.

[30] Gräff J, Kahn M, Samiei A, Gao J, Ota KT, Rei D, et al. A Dietary Regimen of Caloric Restriction or Pharmacological Activation of SIRT1 to Delay the Onset of Neurodegeneration. *J Neurosci* 2013;33:8951–60. doi:10.1523/JNEUROSCI.5657-12.2013.

[31] Ferreira FR, Spini VBMG, Lopes EJ, Lopes RFF, Moreira EA, Amaral MAF, et al. Effect of feed restriction on learning, memory and stress of rodents. *Biosci J* 2006;22.

[32] Riddle MC, McKenna MC, Yoon YJ, Pattwell SS, Santos PMG, Casey BJ, et al. Caloric restriction enhances fear extinction learning in mice. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 2013;38:930–7. doi:10.1038/npp.2012.268.

[33] Dong W, Wang R, Ma L-N, Xu B-L, Zhang J-S, Zhao Z-W, et al. Influence of age-related learning and memory capacity of mice: different effects of a high and low caloric diet. *Aging Clin Exp Res* 2016;28:303–11. doi:10.1007/s40520-015-0398-0.

- [34] Ma L, Zhao Z, Wang R, Zhang X, Zhang J, Dong W, et al. Caloric restriction can improve learning ability in C57/BL mice via regulation of the insulin-PI3K/Akt signaling pathway. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol* 2014;35:1381–6. doi:10.1007/s10072-014-1717-5.
- [35] Zainuddin MSA, Thuret S. Nutrition, adult hippocampal neurogenesis and mental health. *Br Med Bull* 2012;103:89–114. doi:10.1093/bmb/lds021.
- [36] Jahng JW, Kim JG, Kim HJ, Kim B-T, Kang D-W, Lee J-H. Chronic food restriction in young rats results in depression- and anxiety-like behaviors with decreased expression of serotonin reuptake transporter. *Brain Res* 2007;1150:100–7. doi:10.1016/j.brainres.2007.02.080.
- [37] Fusco S, Ripoli C, Podda MV, Ranieri SC, Leone L, Toietta G, et al. A role for neuronal cAMP responsive-element binding (CREB)-1 in brain responses to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:621–6. doi:10.1073/pnas.1109237109.
- [38] Guarente L. Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell* 2008;132:171–6. doi:10.1016/j.cell.2008.01.007.
- [39] ONU. Mundo terá 2 bilhões de idosos em 2050; OMS diz que “envelhecer bem deve ser prioridade global.” Organ Nações Unidas No Bras 2014. <https://nacoesunidas.org/mundo-tera-2-bilhoes-de-idosos-em-2050-oms-diz-que-envelhecer-bem-deve-ser-prioridade-global/> (accessed June 12, 2016).
- [40] Graham LC, Harder JM, Soto I, de Vries WN, John SWM, Howell GR. Chronic consumption of a western diet induces robust glial activation in aging mice and in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Sci Rep* 2016;6:21568. doi:10.1038/srep21568.
- [41] Mattson MP. The Impact of Dietary Energy Intake on Cognitive Aging. *Front Aging Neurosci* 2010;2. doi:10.3389/neuro.24.005.2010.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste projeto de Dissertação estão inseridos em um Projeto universal, no qual foram avaliados os efeitos da restrição calórica suplementada ou não com ácidos graxos ômega-3 em diversos desfechos. Dentre eles, dois trabalhos de conclusão de curso, finalizados em 2015, que avaliaram os efeitos das intervenções dietéticas no estado nutricional dos animais e no estresse oxidativo. Além disso, neste ano será finalizado outro trabalho de conclusão de curso referente aos efeitos da RC na expressão das sirtuínas da família 1 (SIRT-1).

Somada a essas análises, serão ainda analisadas o conteúdo e atividades da proteína PGC1- $\alpha$  e do BDNF, ambos envolvidas em processos que geram neuroproteção. Com isso, é esperado que se possa analisar outros parâmetros envolvidos com o processo comportamental e neuroprotetor relacionado com a RC, ou seja, a análise de alterações periféricas e centrais mediadas pela intervenção dietética.

Visto que na literatura não há padronização do protocolo, o que obstaculiza a comparação dos resultados, é almejada a implementação do protocolo dietético de RC. Por isso, uma das perspectivas do trabalho, é a padronização do protocolo, visto que não causou alterações relacionadas às variáveis bioquímicas séricas analisadas e às variáveis comportamentais e motoras.

É pretendido analisar a ação das quatro modalidades de intervenção dietética em um modelo de inflamação sistêmica (projeto a ser submetido para órgão de fomento CNPq) e os seus efeitos sobre marcadores inflamatórios e sobre os níveis hormonais. Será analisado: 1) os níveis circulantes de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), de adipocitocinas (leptina, adiponectina e resistina), de insulina e IGF-1; 2) conteúdo e atividade de proteínas relacionadas aos efeitos da RC (FOXO, SIRT-1, AMPK, NF $\kappa$ B) no tecido adiposo, fígado, músculo e hipotálamo; 3) conteúdo e atividade de proteínas ligadas à sinalização da insulina (IRS-1; Akt; PI3K, ERK1/2, CREB) e 4) expressão de TLR4 em monócitos. Assim, será possível investigar a rede integrativa de modificações fisiológicas, comportamentais e metabólicas conduzidas por estas intervenções dietéticas.

O presente projeto, juntamente com os demais resultados que serão publicados, representa grande contribuição para o panorama nacional nessa temática. No Brasil, existem, até o momento, sete grupos cadastrados no CNPq que estudam os efeitos da restrição calórica em diversos parâmetros, entre eles, obesidade e fisiologia cardiovascular no parâmetro comportamental induzido pelo estresse. Entretanto, não

constam nesses grupos ou em artigos nacionais e internacionais publicados até o momento, pesquisas relacionadas à avaliação do sinergismo da RC com os ácidos graxos ômega-3 sobre parâmetros comportamentais. Assim, o projeto coopera tanto nacional quanto internacionalmente nos resultados resultantes dessas intervenções nutricionais e seus efeitos comportamentais em animais.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. M. et al. Caloric restriction and age affect synaptic proteins in hippocampal CA3 and spatial learning ability. **Experimental Neurology**, v. 211, n. 1, p. 141–149, maio 2008.
- ALTAREJOS, J. Y.; MONTMINY, M. CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 3, p. 141–151, mar. 2011.
- AMIGO, I.; KOWALTOWSKI, A. J. Dietary restriction in cerebral bioenergetics and redox state. **Redox Biology**, v. 2, p. 296–304, 2014.
- BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study “recognition memory”. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1306–1311, 2006.
- BISHOP, N. A.; GUARENTE, L. Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 11, p. 835–844, nov. 2007.
- BOCKAERT, J.; MARIN, P. mTOR in Brain Physiology and Pathologies. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 4, p. 1157–1187, out. 2015.
- BORDONE, L.; GUARENTE, L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 4, p. 298–305, abr. 2005.
- BRUSS, M. D. et al. Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 298, n. 1, p. E108-116, jan. 2010.
- BRYAN, J.; CALVARESI, E.; HUGHES, D. Short-term folate, vitamin B-12 or vitamin B-6 supplementation slightly affects memory performance but not mood in women of various ages. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 6, p. 1345–1356, jun. 2002.
- CANELLA, D. S. et al. Ultra-Processed Food Products and Obesity in Brazilian Households (2008–2009). **PLOS ONE**, v. 9, n. 3, p. e92752, 25 mar. 2014.

CARLSON, A. J.; HOELZEL, F. Apparent prolongation of the life span of rats by intermittent fasting. **The Journal of Nutrition**, v. 31, p. 363–375, mar. 1946.

CASTRO, A. A. et al. Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease. **Brain Research**, v. 1513, p. 103–116, 4 jun. 2013.

CAVA, E.; FONTANA, L. Will calorie restriction work in humans? **Ageing**, v. 5, n. 7, p. 507–514, jul. 2013.

CERQUEIRA, F. M.; KOWALTOWSKI, A. J. Commonly adopted caloric restriction protocols often involve malnutrition. **Ageing Research Reviews**, v. 9, n. 4, p. 424–430, out. 2010.

CHOI, K. M. et al. The effects of caloric restriction on fetuin-A and cardiovascular risk factors in rats and humans: a randomized controlled trial. **Clinical Endocrinology**, v. 79, n. 3, p. 356–363, set. 2013.

COLMAN, R. J. et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. **Science (New York, N.Y.)**, v. 325, n. 5937, p. 201–204, 10 jul. 2009.

COLMAN, R. J. et al. Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. **Nature Communications**, v. 5, p. 3557, 2014a.

COLMAN, R. J. et al. Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. **Nature Communications**, v. 5, p. 3557, 2014b.

CONTESTABILE, A. Benefits of caloric restriction on brain aging and related pathological States: understanding mechanisms to devise novel therapies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 350–361, 2009.

DAUNCEY, M. J. New insights into nutrition and cognitive neuroscience. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 68, n. 4, p. 408–415, nov. 2009.

- DE ASSIS, A. M. et al.  $\Omega$ 3-Polyunsaturated fatty acids prevent lipoperoxidation, modulate antioxidant enzymes, and reduce lipid content but do not alter glycogen metabolism in the livers of diabetic rats fed on a high fat thermolyzed diet. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 361, n. 1–2, p. 151–160, fev. 2012.
- DE ASSIS, A. M. et al. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids revert renal responses induced by a combination of 2 protocols that increase the amounts of advanced glycation end product in rats. **Nutrition Research (New York, N.Y.)**, v. 35, n. 6, p. 512–522, jun. 2015.
- DODD, P. R.; BRADFORD, H. F. A superfusion system for long-term studies on cerebral cortex in vivo. **Biochemical Society Transactions**, v. 4, n. 1, p. 13–19, 1976.
- D'ONOFRIO, N. et al. Sirtuins in vascular diseases: Emerging roles and therapeutic potential. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1852, n. 7, p. 1311–1322, jul. 2015.
- FAROOQUI, A. A. n-3 fatty acid-derived lipid mediators in the brain: new weapons against oxidative stress and inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 532–543, 2012.
- FERREIRA, F. R. et al. Effect of feed restriction on learning, memory and stress of rodents. **Bioscience Journal**, v. 22, n. 1, 20 jul. 2006.
- FONTANA, L. et al. Effects of 2-year calorie restriction on circulating levels of IGF-1, IGF-binding proteins and cortisol in nonobese men and women: a randomized clinical trial. **Aging Cell**, v. 15, n. 1, p. 22–27, 1 fev. 2016.
- FONTANA, L.; PARTRIDGE, L.; LONGO, V. D. Extending healthy life span--from yeast to humans. **Science (New York, N.Y.)**, v. 328, n. 5976, p. 321–326, 16 abr. 2010.
- FRANCIS, H.; STEVENSON, R. The longer-term impacts of Western diet on human cognition and the brain. **Appetite**, v. 63, p. 119–128, abr. 2013.



FRAUTSCHY, S. A. et al. Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of Abeta-induced cognitive deficits and neuropathology. **Neurobiology of Aging**, v. 22, n. 6, p. 993–1005, dez. 2001.

FUSCO, S. et al. A role for neuronal cAMP responsive-element binding (CREB)-1 in brain responses to calorie restriction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 2, p. 621–626, 10 jan. 2012.

GENARO, P. DE S.; SARKIS, K. S.; MARTINI, L. A. Effect of caloric restriction on longevity. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 667–672, jul. 2009.

GENG, Y.-Q. et al. SIRT1 and SIRT5 activity expression and behavioral responses to calorie restriction. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 12, p. 3755–3761, dez. 2011.

GILLETTE-GUYONNET, S.; SECHER, M.; VELLAS, B. Nutrition and neurodegeneration: epidemiological evidence and challenges for future research. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 738–755, mar. 2013.

GÓMEZ-PINILLA, F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 568–578, jul. 2008.

GOULD, T. J. et al. Effects of dietary restriction on motor learning and cerebellar noradrenergic dysfunction in aged F344 rats. **Brain Research**, v. 684, n. 2, p. 150–158, 3 jul. 1995.

GRÄFF, J. et al. A Dietary Regimen of Caloric Restriction or Pharmacological Activation of SIRT1 to Delay the Onset of Neurodegeneration. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 21, p. 8951–8960, 22 maio 2013.

GUARENTE, L. Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? **Cell**, v. 132, n. 2, p. 171–176, 25 jan. 2008.

GUARENTE, L. Calorie restriction and sirtuins revisited. **Genes & Development**, v. 27, n. 19, p. 2072–2085, 10 jan. 2013.

- HALTON, T. L. et al. Potato and french fry consumption and risk of type 2 diabetes in women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 2, p. 284–290, 2 jan. 2006.
- HAN, X.; REN, J. Caloric restriction and heart function: is there a sensible link? **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 9, p. 1111–1117, set. 2010.
- KUHLA, A. et al. Lifelong caloric restriction increases working memory in mice. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68778, 2013.
- LI, L.; WANG, Z.; ZUO, Z. Chronic Intermittent Fasting Improves Cognitive Functions and Brain Structures in Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 3 jun. 2013.
- MA, L. et al. Caloric restriction can improve learning ability in C57/BL mice via regulation of the insulin-PI3K/Akt signaling pathway. **Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology**, v. 35, n. 9, p. 1381–1386, set. 2014.
- MA, L. et al. Effect of caloric restriction on the SIRT1/mTOR signaling pathways in senile mice. **Brain Research Bulletin**, v. 116, p. 67–72, jul 2015.
- MAALOUF, M.; RHO, J. M.; MATTSON, M. P. The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. **Brain Research Reviews**, v. 59, n. 2, p. 293–315, mar. 2009.
- MARTIN, B.; MATTSON, M. P.; MAUDSLEY, S. Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging. **Ageing Research Reviews**, v. 5, n. 3, p. 332–353, ago. 2006.
- MARTIN, C. K. et al. Examination of cognitive function during six months of calorie restriction: results of a randomized controlled trial. **Rejuvenation Research**, v. 10, n. 2, p. 179–190, jun. 2007.
- MASORO, E. J.; YU, B. P.; BERTRAND, H. A. Action of food restriction in delaying the aging process. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 13, p. 4239–4241, jul. 1982.

MATHEUS, F. C. et al. Decreased synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex underlies short-term memory deficits in 6-OHDA-lesioned rats. **Behavioural Brain Research**, v. 301, p. 43–54, 15 mar. 2016.

MATTSON, M. P. et al. Prophylactic Activation of Neuroprotective Stress Response Pathways by Dietary and Behavioral Manipulations. **NeuroRx**, v. 1, n. 1, p. 111–116, jan. 2004.

MATTSON, M. P. The Impact of Dietary Energy Intake on Cognitive Aging. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 2, 8 mar. 2010.

MATTSON, M. P. Lifelong brain health is a lifelong challenge: From evolutionary principles to empirical evidence. **Ageing Research Reviews**, Behavior, Energy Overload and Brain Health: From Science to Society. v. 20, p. 37–45, mar. 2015.

MCCAY C. M.; CROWELL M. F.; MAYNARD L. A. Journal of Nutrition. **The effect of retarded growth upon the length of life span and upon ultimate body size**, v. 10, n. 1, p. 63–79, 1935.

MCCUTCHEON, J. E.; MARINELLI, M. Age matters. **The European Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 5, p. 997–1014, mar. 2009.

MURPHY, T. et al. Effects of Diet on Brain Plasticity in Animal and Human Studies: Mind the Gap, Effects of Diet on Brain Plasticity in Animal and Human Studies: Mind the Gap. **Neural Plasticity, Neural Plasticity**, v. 2014, 2014, p. e563160, 12 maio 2014.

OKRĘGLICKA, K. Health effects of changes in the structure of dietary macronutrients intake in western societies. **Roczniki Państwowego Zakładu Higieny**, v. 66, n. 2, p. 97–105, 2015.

PANI, G. Neuroprotective effects of dietary restriction: Evidence and mechanisms. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 40, p. 106–114, abr. 2015.

PIPER, V. A. et al. Dieta DASH na redução dos níveis de pressão arterial e prevenção do acidente vascular cerebral. **Sci. med**, v. 22, n. 2, abr. 2012.

PRZYBELSKI, R. J.; BINKLEY, N. C. Is vitamin D important for preserving cognition? A positive correlation of serum 25-hydroxyvitamin D concentration with cognitive function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 460, n. 2, p. 202–205, 15 abr. 2007.

QI, L. et al. Genetic predisposition, Western dietary pattern, and the risk of type 2 diabetes in men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 5, p. 1453–1458, maio 2009.

QUILLFELDT, J.A., **Behavioral Methods to Study. Learning and Memory in Rats**. v.21, maio, 2006.

RAMSEY, J. J. et al. Dietary restriction and aging in rhesus monkeys: the University of Wisconsin study. **Experimental Gerontology**, v. 35, n. 9–10, p. 1131–1149, dez. 2000.

RAVUSSIN, E. et al. A 2-Year Randomized Controlled Trial of Human Caloric Restriction: Feasibility and Effects on Predictors of Health Span and Longevity. **The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 70, n. 9, p. 1097–1104, set. 2015.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, nov. 1993.

RIBEIRO, L. C. et al. Caloric restriction increases hippocampal glutamate uptake and glutamine synthetase activity in Wistar rats. **Neuroscience Research**, v. 64, n. 3, p. 330–334, jul. 2009.

RIZZA, W.; VERONESE, N.; FONTANA, L. What are the roles of calorie restriction and diet quality in promoting healthy longevity? **Ageing Research Reviews**, v. 13, p. 38–45, jan. 2014.

SEBBEN, ALESSANDRA DEISE et al. Efeito de fatores neutrotóficos sobre o reparo de nervo periférico. **Scientia Medica**, v. 21, n. 2, p. 81–89, 2011.

SMITH, P. J. et al. Effects of the dietary approaches to stop hypertension diet, exercise, and caloric restriction on neurocognition in

overweight adults with high blood pressure. **Hypertension**, v. 55, n. 6, p. 1331–1338, jun. 2010.

SOARES, E. et al. Spatial memory impairments in a prediabetic rat model. **Neuroscience**, v. 250, p. 565–577, 10 out. 2013.

SOLON-BIET, S. M. et al. Macronutrients and caloric intake in health and longevity. **The Journal of endocrinology**, v. 226, n. 1, p. R17–R28, jul. 2015.

SZAFRANSKI, K.; MEKHAIL, K. The fine line between lifespan extension and shortening in response to caloric restriction. **Nucleus (Austin, Tex.)**, v. 5, n. 1, p. 56–65, fev. 2014.

THRASIVOULOU, C. et al. Reactive oxygen species, dietary restriction and neurotrophic factors in age-related loss of myenteric neurons. **Aging Cell**, v. 5, n. 3, p. 247–257, jun. 2006.

TRICHOPOULOU, A. et al. Definitions and potential health benefits of the Mediterranean diet: views from experts around the world. **BMC Medicine**, v. 12, p. 112, 2014.

VALLS-PEDRET, C. et al. Mediterranean Diet and Age-Related Cognitive Decline: A Randomized Clinical Trial. **JAMA internal medicine**, v. 175, n. 7, p. 1094–1103, jul. 2015.

VAN DE REST, O. et al. Dietary patterns, cognitive decline, and dementia: a systematic review. **Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)**, v. 6, n. 2, p. 154–168, mar. 2015.

VAN GELDER, B. M. et al. Fish consumption, n-3 fatty acids, and subsequent 5-y cognitive decline in elderly men: the Zutphen Elderly Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 4, p. 1142–1147, abr. 2007.

VORHEES, C. V.; WILLIAMS, M. T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **Nature protocols**, v. 1, n. 2, p. 848–858, 2006.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 322–328, mar. 2007.

WARBURTON, E. C.; BROWN, M. W. Neural circuitry for rat recognition memory. **Behavioural Brain Research**, SI: Object Recognition Memory in Rats and Mice. v. 285, p. 131–139, 15 maio 2015.

WEISS, E. P.; FONTANA, L. Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, n. 4, p. H1205–H1219, out. 2011.

WENGREEN, H. et al. Prospective study of Dietary Approaches to Stop Hypertension- and Mediterranean-style dietary patterns and age-related cognitive change: the Cache County Study on Memory, Health and Aging. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 98, n. 5, p. 1263–1271, nov. 2013.

YON, M. A.; MAUGER, S. L.; PICKAVANCE, L. C. Relationships between dietary macronutrients and adult neurogenesis in the regulation of energy metabolism. **The British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 9, p. 1573–1589, maio 2013.

ZAINUDDIN, M. S. A.; THURET, S. Nutrition, adult hippocampal neurogenesis and mental health. **British Medical Bulletin**, v. 103, n. 1, p. 89–114, set. 2012.

## APÊNDICE A – Matriz de síntese com estudos sobre RC e comportamento (continua)

TÍTULO/ REFERÊNCIA	MODELO ANIMAL	FATOR DIETÉTICO/ INTERVENÇÃO	MECANISMO(S) ANALISADO(S)	TESTES/TÉCNICAS UTILIZADOS	CONCLUSÕES PRINCIPAIS
FERREIRA et al, 2006	Ratos Wistar Machos Idade: 7 semanas	Grupo RC30% Grupo RC60% Duração: 15 semanas	Efeito da RC nos parâmetros de aprendizagem, memória e estresse.	TCA TLY	Grupos RC 30%: ⊕ desempenho na aprendizagem comparado ao grupo controle. Grupo RC 60%: não houve melhora no comportamento
GENG et al., 2011	Ratos Sprague- Dawley Idade: 18 meses	RC 40% Duração: 6 meses	Desempenho comportamental e expressão da SIRT1 e SIRT5	TLAM	RC: ↓ Capacidade cognitiva retardada ↑ Expressão SIRT1 e SIRT5 de ratos RC em comparação com os ratos AL.
GRAFF et al., 2013	Camundongos CK-p25 (ambos os sexos) os com Idade: 3 meses	30% de RC, grupos: Controle <i>ad libitum</i> , CK-p25 <i>ad libitum</i> e CK-p25 RC. Duração: 3 meses	Efeitos da RC na neurodegeneração e na expressão da proteína SIRT1 e avaliação comportamental.	TCA; Câmara de condicionamento de medo; TRO.	RC: preservou a integridade neuronal e densidade sináptica (↑nº de neurônios e de sinapses funcionais) e ⊕ Plasticidade sináptica. Preservação da memória de reconhecimento e ausência de alterações na ansiedade, comportamento exploratório e atividade locomotora dos animais RC.

## APÊNDICE A: Matriz de síntese com estudos sobre RC e comportamento (conclusão)

TÍTULO/ REFERÊNCIA	MODELO ANIMAL	FATOR DIETÉTICO/ INTERVENÇÃO	MECANISMO(S) ANALISADO(S)	TESTES/TÉCNICAS UTILIZADOS	CONCLUSÕES PRINCIPAIS
KUHLA et al. 2013	Camundongos C57BL/6 Fêmeas Idade: 21 dias	RC de 40% Duração: 4, 20 e 74 semanas	Alterações na memória moduladas pela RC	Teste acelerod TCA TLCE TLAM	↑Ansiedade com o avançar da intervenção ↑Memória de trabalho no grupo RC74 ↓Coordenação motora no grupo RC74
MA et al., 2014	Camundongos C57/BL machos Idade: 7 semanas	RC progressiva: 10% na 1ª semana; 20% na 2ª semana e 30% da 3ª até a 30ª semana  Duração: 30 semanas	Mudanças nas vias de sinalização da insulina sobre os mecanismos afetados pela RC, como a aprendizagem e a memória.	TLAM	Dieta RC ⊕ capacidade de aprendizagem espacial dependente do hipocampo. Ratos RC: ↓ dos níveis glicêmicos séricos e de IGF-1 do que o grupo controle.
DONG et al, 2016	Camundongos C57/BL machos Idade: 6 semanas	Grupo controle(NC), grupo baixa caloria (LC) e grupo alta caloria (HC). Razão energética das dietas 1:0,7:1,3 Duração: 10 meses	Investigar mudanças na cognição, neurônios hipocampais e astrócitos mediadas pela dieta.	TLAM	Grupos NC e LC: ↑ tempo no quadrante da plataforma NC e LC: ↑ tempo na plataforma durante o teste em relação ao grupo HC Não houve diferença da velocidade entre os grupos

Legenda: SIRT: sirtuínas; TCA: teste do campo aberto; TLY: Teste do labirinto em Y; AL: *ad libitum*; ↑ aumento; ↓ redução; ⊕ melhora; TLCE: Teste do labirinto em cruz elevado; TRO: Teste do reconhecimento de objetos; TLAM: Teste do labirinto aquático de Morris.



**APÊNDICE B: Modelo de planilha para cálculo da média do consumo alimentar semanal do grupo controle**

## SEMANA 04

<b>DATA</b>		<b>CAIXA 01</b>	<b>CAIXA 02</b>	<b>CAIXA 03</b>
06/08	Oferta	180	180	180
07/08	Sobra			
07/08	Oferta	180	180	180
08/08	Sobra			
08/08	Oferta	180	180	180
09/08	Sobra			
09/08	Oferta	180	180	180
10/08	Sobra			
10/08	Oferta	180	180	180
11/08	Sobra			
11/08	Oferta	180	180	180
12/08	Sobra			
12/08	Oferta	180	180	180
13/08	Sobra			



## **APÊNDICE C: Nota de imprensa**

Mestranda: Cinthia Rejane Corrêa

Orientadora: Júlia Dubois Moreira

Órgão financiador da bolsa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Órgão financiador do projeto: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Os resultados da pesquisa do trabalho de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina fazem parte de um projeto universal cujo financiamento foi concedido pelo CNPq, além disso, a bolsa de mestrado, fornecida durante vinte e quatro meses, foi fornecida pela CAPES. Juntamente à dissertação, foram desenvolvidos dois Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC) no ano de 2015 e outro TCC que está em desenvolvimento e será finalizado ao final deste ano.

Os estudos experimentais em animais, no caso os roedores, são essenciais na evolução de estudos que visam avaliar o efeito de intervenções, como as intervenções nutricionais. A partir destes resultados, é avaliada a segurança, aplicabilidade e reprodutibilidade destes estudos em humanos, visando replicar os efeitos encontrados e seus possíveis benefícios observados nos animais.

O primeiro estudo sobre restrição calórica foi publicado em 1934 e, desde lá, são estudados seus potenciais benefícios ligados ao processo de envelhecimento. A restrição calórica é definida como a redução da ingestão de calorias sem desnutrição, ou seja, com a garantia de ingestão de vitaminas e minerais. Os efeitos da restrição calórica na atenuação de processos envolvidos no envelhecimento, na atenuação do estresse oxidativo, na redução do peso corporal e nos marcadores hormonais e celulares são descritos na literatura científica. Um potencial efeito benéfico à saúde mediado pela restrição calórica é o efeito protetor cerebral, contudo, ainda há divergências nesses resultados, relacionados, por exemplo, à redução da ansiedade e melhora da memória. Por isso, o trabalho teve como intuito avaliar os efeitos da restrição calórica no comportamento de ratos, bem como, avaliar o efeito da mesma no estado nutricional.

A intervenção testada no presente projeto foi aplicada em ratos da linhagem Wistar, machos, com duração de doze semanas. Os animais foram divididos em dois grupos: o grupo controle, que recebeu a dieta padrão e o grupo restrição calórica, que recebeu a mesma dieta que o

controle, porém, houve restrição no volume da ração até chegar a redução de 30% da média do consumo semanal do grupo controle. Além da redução, foi adicionada a mesma porcentagem progressiva de micronutrientes a fim de não gerar desnutrição. O intuito desta intervenção dietética foi avaliar os efeitos da restrição calórica nestes animais nos parâmetros comportamentais, analisados por testes comportamentais durante a última semana de intervenção e nos parâmetros relacionados com o estado nutricional, por meio de análises bioquímicas séricas.

Resumidamente, os resultados mostraram que além da manutenção do estado nutricional dos animais quando aplicado o protocolo de restrição calórica, não houve prejuízo cognitivo dos mesmos em relação à atividade locomotora, ansiedade e memória. Além destes resultados, o projeto pretende propor a padronização do protocolo dietético de restrição calórica, visto que na literatura ainda não há um consenso quanto à composição centesimal das dietas, com isso, seria possível a comparação de forma mais fidedigna dos resultados referentes aos estudos aplicados nesta temática.

Por fim, os resultados desta dissertação pretendem contribuir com a literatura científica no âmbito da restrição calórica e seus efeitos salutareos tanto no comportamento, quanto no estado nutricional e metabolismo dos animais.

**ANEXO A – Parecer de aprovação do CEUA/UFSC**

Florianópolis, 13 de Agosto de 2015.

**Srs. Membros da Comissão de ética no Uso de Animais - CEUA/UFSC**

O presente documento trata do parecer de apreciação do projeto com protocolo **PP00973** intitulado

**Avaliação dos efeitos da restrição calórica e dos ácidos graxos  $\omega$ 3 sobre parâmetros**

**bioquímicos, comportamentais e neuroprotetores em ratos** coordenado pela **Profa. Dra.**

**Letícia Carina Ribeiro da Silva - Departamento de Nutrição – Centro de Ciências Biológicas - UFSC.**

Na apreciação anterior, surgiram alguns questionamentos, que foram satisfatoriamente esclarecidos. Dessa forma, sou de parecer favorável à aprovação do protocolo PP00973.