

Ciclos de Jejum/Realimentação Previnem Disfunção Miocárdica e Danos Morfológicos em Ratos Espontaneamente Hipertensos

Fasting/Refeeding Cycles Prevent Myocardial Dysfunction and Morphology Damage in the Spontaneously Hypertensive Rats

Matheus Fécchio Pinotti,¹ Amanda Martins Matias,² Mário Mateus Sugizaki,³ André Ferreira do Nascimento,³ Maeli Dal Pai,^{3,4} Ana Paula Lima Leopoldo,² Antônio Carlos Cicogna,¹ André Soares Leopoldo²

Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista (UNESP),¹ Botucatu, SP - Brasil

Departamento de Desportos, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES),² Vitória, ES - Brasil

Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT),³ Cuiabá, MT - Brasil

Departamento de Morfologia, Instituto de Biosciências da Universidade Estadual Paulista UNESP,⁴ Botucatu, SP - Brasil

Resumo

Fundamento: A restrição calórica compromete a função e a morfologia cardíacas em corações hipertrofiados de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). No entanto, a influência de ciclo de jejum/realimentação é desconhecida.

Objetivo: Investigar o efeito de ciclos de jejum/realimentação sobre a remodelação e função miocárdica. Além disso, o presente estudo foi desenhado para avaliar os mecanismos subjacentes à participação do trânsito de cálcio (Ca^{2+}) e sistema beta-adrenérgico.

Métodos: Neste estudo, SHR machos de 60 dias de idade foram submetidos a alimento *ad libitum* (grupo C), 50% de restrição alimentar (grupo R₅₀) ou ciclos de RF (grupo RF) por 90 dias. A remodelação cardíaca foi avaliada por meio da análise ultraestrutural e função do músculo papilar isolado. Adotou-se o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

Resultados: Os ratos do grupo RF apresentaram menor atrofia cardíaca do que os do grupo R₅₀ em relação aos do grupo C. Os ratos do grupo C aumentaram peso corporal, os ratos do grupo R₅₀ mantiveram seu peso corporal inicial e os ratos do grupo RF aumentaram e reduziram seu peso durante o ciclo RF. O ciclo RF não causou comprometimento funcional, pois os parâmetros isotônicos e isométricos apresentaram comportamento similar aos dos ratos do grupo C. Os parâmetros cardíacos isotônicos e isométricos mostraram-se significativamente elevados nos ratos do grupo RF em comparação aos dos ratos do grupo R₅₀. Além disso, os ratos do grupo R₅₀ apresentaram dano cardíaco em comparação aos ratos do grupo C quanto às variáveis isotônicas e isométricas. Os ratos do grupo R₅₀ apresentaram alterações focais em muitas fibras musculares, enquanto os ratos do grupo RF apresentaram leves alterações, como perda ou desorganização de miofibrilas.

Conclusão: Ciclos de Jejum/Realimentação promovem efeitos benéficos cardíacos e atenuam o dano miocárdico causado por restrição calórica em SHR, contribuindo para reduzir o risco cardiovascular e os danos morfológicos. Além disso, o ciclo de jejum/realimentação promove leve melhora do trânsito do Ca^{2+} e do sistema beta-adrenérgico. (Arq Bras Cardiol. 2018; [online].ahead print, PP.0-0)

Palavras-chave: Ratos; Hipertensão; Miocárdio/disfunção; Doença Crônica; Realimentação; Restrição Calórica.

Abstract

Background: Caloric restriction is known to impair the cardiac function and morphology in hypertrophied hearts of spontaneously hypertensive rats (SHR); however, the influence of fasting/refeeding (RF) is unknown.

Objective: To investigate the fasting/refeeding approach on myocardial remodeling and function. In addition, the current study was designed to bring information regarding the mechanisms underlying the participation of Ca^{2+} handling and β -adrenergic system.

Methods: Sixty-day-old male SHR rats were submitted to food *ad libitum* (C), 50% food restriction (R₅₀) or RF cycles for 90 days. Cardiac remodeling was assessed by ultrastructure analysis and isolated papillary muscle function. The level of significance considered was 5% ($\alpha = 0.05$).

Results: The RF rats presented lower cardiac atrophy than R₅₀ in relation to C rats. The C rats increased weight gain, R₅₀ maintained their initial body weight and RF rats increased and decreased weight during RF. The RF did not cause functional impairment because the isotonic and isometric parameters showed similar behavior to those of C. The isotonic and isometric cardiac parameters were significantly elevated in RF rats compared to R₅₀ rats. In addition, the R₅₀ rats had cardiac damage in relation to C for isotonic and isometric variables. While the R₅₀ rats showed focal changes in many muscle fibers, the RF rats displayed mild alterations, such as loss or disorganization of myofibrils.

Conclusion: Fasting/refeeding promotes cardiac beneficial effects and attenuates myocardial injury caused by caloric restriction in SHR rats, contributing to reduce the cardiovascular risk profile and morphological injuries. Furthermore, RF promotes mild improvement in Ca^{2+} handling and β -adrenergic system. (Arq Bras Cardiol. 2018; [online].ahead print, PP.0-0)

Keywords: Rats; Hypertension; Myocardial/dysfunction; Chronic Disease; Fasting; Refeeding; Caloric Restriction.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: André Soares Leopoldo •

Avenida Fernando Ferrari, 514. CEP 29075-410, Goiabeiras, Vitória, ES – Brasil

E-mail: andresoaulesleopoldo@gmail.com, andre.leopoldo@ufes.br

Artigo recebido em 10/11/2017, revisado em 09/05/2018, aceito em 09/05/2018

Introdução

As principais causas de mortalidade por doenças crônicas não-transmissíveis (DCNTs) são doença cardiovascular, câncer, doença respiratória crônica e diabetes.¹ Essas condições compartilham um pequeno número de fatores de risco comportamentais, que agravam as DCNTs e incluem dieta não saudável, intimamente relacionada com hipertensão.

Há muito a restrição calórica (RC) é conhecida por promover vários efeitos benéficos.^{2,3} No entanto, embora a RC possa evitar o dano cardíaco em corações hipertrofiados de ratos espontaneamente hipertensos (SHR),⁴ é comum notar-se flutuação do peso corporal tipicamente denominada "síndrome do iô-iô" durante uma dieta rígida, tendo tal flutuação mostrado efeitos cardiovasculares deletérios.^{5,6} Pesquisas de nosso laboratório e de outros mostraram que a restrição alimentar severa pode causar danos morfológicos e comprometimento da função cardíaca em ratos normais e SHR.⁷⁻¹²

Recentemente, jejum intermitente ou ciclos de jejum/realimentação também mostrou ser capaz de prolongar a vida e apresentar efeitos benéficos para a saúde quando comparado ao consumo de alimento *ad libitum*,^{3,13,14} pois melhora a função cardiovascular e vários fatores de risco de doenças cardiovasculares.^{15,16} Essa abordagem alimentar implica também em efeito protetor contra estresse oxidativo, menores taxas de doença renal,¹⁷ prolongamento da função reprodutiva,¹⁸ normalização do gasto energético de repouso e recuperação da síntese proteica, mas pode causar muitos distúrbios metabólicos.^{19,20}

Em ratos normotensos submetidos à restrição alimentar, a realimentação diminuiu a incidência de arritmia cardíaca e reverteu a depleção de proteínas cardíacas.^{21,22} A restrição alimentar causou distúrbios na função cardíaca, que foram quase que completamente revertidos ao normal após realimentação, em coração de rato isolado.²³ No nosso laboratório, observamos que ciclos de jejum/realimentação revertem a disfunção mecânica e atenuaram os danos estruturais nos músculos papilares causados por RC em ratos normotensos.²⁴ No entanto, ainda não está claro se os ciclos de jejum/realimentação podem promover efeitos similares e/ou reverter o dano cardíaco induzido por restrição alimentar em SHR.⁷⁻¹² Portanto, este estudo teve por objetivo investigar a abordagem jejum/realimentação sobre a remodelação e função miocárdica. Além disso, o presente estudo foi projetado para obter informação quanto aos mecanismos subjacentes à participação do trânsito do Ca²⁺ e do sistema beta-adrenérgico. Nossa hipótese é que a condição jejum/realimentação atenuaria o dano miocárdico causado pela restrição alimentar e contribuiria para o remodelamento cardíaco normal em SHR sem alterações do trânsito do Ca²⁺ e do sistema beta-adrenérgico.

Métodos

Modelo animal e protocolo experimental

Neste estudo, SHR machos de 60 dias de idade foram distribuídos em três grupos: controle (grupo C, n = 7); restrição alimentar (grupo R₅₀, n = 7); e ciclos de jejum/realimentação (grupo RF, n = 7). O grupo C foi alimentado com água *ad*

libitum e ração *Labina* com a seguinte composição: 7,0% de gordura; 20,55% de proteína; 62,95% de carboidrato; 5,0% de fibra e 4,5% de teor de umidade (Agribands, Brasil). A Tabela 1 mostra a composição da ração *Labina*. O grupo R₅₀ recebeu 50% da quantidade de alimento consumida pelo grupo C. O grupo RF foi submetido a ciclos de restrição alimentar de 50% e realimentação *ad libitum* semanalmente. Todos os ratos foram mantidos neste regime alimentar por 90 dias, sendo então sacrificados.

Todos os animais foram alojados em gaiolas individuais em uma sala à temperatura de 23°C e com ciclos de 12 horas claro/escuro, sendo pesados uma vez por semana. Os pesos corporais inicial e final (PCI e PCF, respectivamente), as razões entre os pesos ventriculares esquerdo e direito e o peso corporal final (VE/PCF e VD/PCF, respectivamente) e a área seccional (AS) do músculo papilar foram medidos. Todos os experimentos e procedimentos foram realizados de acordo com o *Guia de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório* publicado pelo *United States National Institutes of Health*, sendo aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, São Paulo, Brasil.

Pressão arterial sistólica

Avaliou-se a pressão arterial sistólica pelo método não invasivo do manguito de cauda com um eletro-esfigmomanômetro Narco BioSystems (*International Biomedical*, Austin, TX, EUA) no início e ao final do protocolo experimental. Registrou-se a média de duas leituras de pressão para cada animal.

Desempenho do músculo isolado

O desempenho contrátil intrínseco do coração foi avaliado estudando-se o músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo (VE), conforme como anteriormente descrito.^{9,10,12} Foram determinados parâmetros de contração isométrica, incluindo tensão desenvolvida (TD, g/mm², definida como tensão isométrica menos tensão de repouso), tensão de

Tabela 1 – Composição da ração *Labina*

Ingredientes	(g/kg)
Amido	397,5
Amido de milho dextrinizado	132,0
Sacarose	100,0
Carboidratos	629,5
Caseína	200,0
L-Cisteína	3,0
Bitartrato de colina	2,5
Proteína	205,5
Óleo de soja	70,0
Gordura	70,0
Fibra	50,0
Mistura de vitaminas	10,0
Mistura de minerais	35,0
Total	1000

repouso (TR, g/mm²), tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida (TPT, ms), velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida (+dT/dt, g/mm²/s) e velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida (-dT/dt, g/mm²/s). Os parâmetros isotônicos foram porcentagem de encurtamento (PS, %), tempo para encurtamento máximo (TPS, ms), velocidade máxima de encurtamento (-dL/dt, ML/s) e velocidade máxima de relaxamento (+dL/dt, ML/s), onde ML/s é o comprimento muscular por segundo.

O comportamento mecânico do músculo papilar foi avaliado sob condições basais de concentração de Ca²⁺ de 1,25 mM e após as seguintes manobras inotrópicas: aumento da concentração de Ca²⁺ extracelular de 0,625 para 1,25, 2,5 e 5,2 mM, e estimulação beta-adrenérgica com 0,01, 0,1 e 1,0 μM de isoproterenol. Os parâmetros usados para caracterizar o músculo papilar foram: comprimento (mm), peso (mg) e AS (mm²). O comprimento muscular associado à TD máxima foi definido como L_{max} *in vitro* e medido com um catetômetro Gartner (Chicago, IL, EUA). Para comparar a função mecânica entre diferentes comprimentos musculares, parâmetros isométricos e isotônicos foram normalizados pela AS e pelo L_{max}.

Estudo morfológico

Para o estudo ultraestrutural (três animais por grupo), pequenos fragmentos do músculo papilar VE foram fixados em solução de Karnovsky em 0,12 M fosfato, pH de 7,2 por 1-2 horas e pós-fixados em 1% tetróxido de ósmio em 0,1 M tampão fosfato por 2 horas.²⁵ Após desidratação em uma série graduada de etanol, as amostras foram incluídas em resina de epóxi. Cortes ultrafinos de áreas selecionadas foram feitos com navalhas de diamante, submetidos a duplo contraste com acetato de uranila e citrato de chumbo, e examinados em microscópio eletrônico Philips EM 301. A AS do miócito VE foi medida com microscópio composto ligado a sistema computadorizado de análise de imagem (Image-Pro Plus 3.0, Media Cybernetics, Silver Springs, MD, EUA).

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa SigmaStat 3.5 (SYSTAT Software Inc., San Jose, CA, EUA). As variáveis das características gerais e da função miocárdica em condição basal com distribuição normal foram expressas como médias ± desvio-padrão (DP). Os grupos foram comparados usando-se análise de variância (ANOVA) de uma via para amostras independentes. Utilizou-se ANOVA de duas vias para medidas repetidas para avaliar a evolução do peso corporal e os efeitos inotrópicos positivos e negativos na função miocárdica. Quando houve diferença significativa (p < 0,05), usou-se os testes post hoc de Tukey ou Bonferroni para comparações múltiplas. Adotou-se o nível de significância de 5%.

Determinou-se o tamanho da amostra (n) com a equação: $n = 1 + [2C * (s/d)^2]$, onde C (z score α + z score β)² depende dos valores escolhidos para poder estatístico do teste (90%; erro tipo II) e nível de significância (0,05; erro tipo I); o valor do desvio-padrão (s) adotado foi 0,25, sendo a mínima diferença entre os grupos (d) de 0,5. O tamanho de amostra necessário

para detectar uma diferença significativa entre os grupos foi de 6,25 ratos por grupo. Entretanto, decidimos usar 7 animais por grupo para a maioria das análises.

Resultados

Características gerais e morfológicas dos ratos

Valores significativamente elevados de PCF, VE, VD, VE/PCF e VD/PCF foram encontrados no grupo C em comparação aos grupos R₅₀ e RF (Tabela 2). Após 12 semanas, os ciclos de jejum/realimentação promoveram substancial elevação do PCF e do consumo alimentar que foram significativamente maiores do que aqueles no grupo R₅₀. Em relação aos parâmetros cardíacos, os grupos RF e R₅₀ apresentaram comportamento diferente. Especificamente, o VE (RF: 12,12% e R₅₀: 48,5%; p < 0,05), o VD (RF: 19,04% e R₅₀: 47,62%; p < 0,05), o VE/PCF (RF: 6,64% e R₅₀: 19,2%; p < 0,05) e o VD/PCF (RF: 12,06% e R₅₀: 18,96%; p < 0,05) apresentaram redução percentual nos ratos dos grupos RF e R₅₀ em comparação àqueles do grupo C. Entretanto, os ratos submetidos aos ciclos de jejum/realimentação apresentaram menos atrofia cardíaca do que os do grupo R₅₀ em relação aos do grupo C.

Além disso, os ratos do grupo C apresentaram ganho corporal crescente, enquanto aqueles do grupo R₅₀ mantiveram seu PCI após 12 semanas de protocolo experimental (Figura 1). Por outro lado, os ratos do grupo RF ganharam peso dependendo da ingestão de alimento, com aumento e redução de peso corporal durante as fases de realimentação e jejum, respectivamente (Figura 1).

Desempenho do músculo isolado

Os ciclos de jejum/realimentação não causaram comprometimento funcional (Tabelas 3 e 4). Entretanto, os parâmetros isotônicos [-dL/dt, TPS, TR₅₀] e isométricos (TPT, +dT/dt, -dT/dt, TR₅₀) mostraram-se significativamente elevados nos ratos do grupo RF em comparação àqueles do grupo R₅₀, indicando que os ciclos de jejum/realimentação preservam a fase de contração e relaxamento da função cardíaca. Além disso, os ratos do grupo R₅₀ apresentaram dano cardíaco em relação aos do grupo C para as variáveis isotônicas e isométricas. A AS do músculo papilar não diferiu entre os grupos.

Estimulação com cálcio extracelular

As elevações da concentração de Ca²⁺ extracelular de 0,625 para 5,2 mM resultaram em efeito inotrópico positivo nos miócitos de todos os grupos (Figuras 2A-F). Entretanto, os resultados mostrados nas Figuras 2B, C e E indicam que o Ca²⁺ extracelular (1,25 e 2,5 mM) induziu maior resposta em +dT/dt (RF: 99,1 ± 23,6; 132,1 ± 36,2 g/mm²/s vs. R₅₀: 63,2 ± 12,8; 91,5 ± 22,0 g/mm²/s; p < 0,05, respectivamente), -dT/dt (RF: 30,6 ± 5,9; 35,9 ± 5,8 g/mm²/s vs. R₅₀: 22,0 ± 4,4; 28,5 ± 6,1 g/mm²/s; p < 0,05, respectivamente) e -dL/dt (RF: 2,19 ± 0,45; 2,77 ± 0,51 ML/s vs. R₅₀: 1,47 ± 0,24; 1,99 ± 0,31 ML/s; p < 0,05, respectivamente) nos ratos do grupo RF do que nos do grupo R₅₀. Além disso, -dT/dt e -dL/dt estavam significativamente reduzidos no miocárdio de ratos do

Tabela 2 – Características gerais dos ratos

Parâmetros	Grupos		
	C	R ₅₀	RF
PCI (g)	247 ± 15	248 ± 12	249 ± 13
PCF (g)	366 ± 14	236 ± 17 [†]	342 ± 21 [†]
CA (g/semana)	159 ± 23	77 ± 4 [†]	130 ± 55 [†]
PAS inicial (mmHg)	177 ± 8	177 ± 5	181 ± 7
PAS final (mmHg)	163 ± 13	157 ± 15	156 ± 5
VE (g)	0,99 ± 0,04	0,51 ± 0,01 [†]	0,87 ± 0,08 [†]
VD (g)	0,21 ± 0,02	0,11 ± 0,01 [†]	0,17 ± 0,02 [†]
VE/PCF (mg/g)	2,71 ± 0,05	2,19 ± 0,16 [†]	2,53 ± 0,08 [†]
VD/PCF (mg/g)	0,58 ± 0,04	0,47 ± 0,05 [†]	0,51 ± 0,05 [†]

C: grupo controle; R₅₀: animais com restrição alimentar de 50%; RF: animais com alternância entre restrição alimentar de 50% e realimentação; PCI: peso corporal inicial; PCF: peso corporal final; CA: consumo alimentar; PAS: pressão arterial sistólica; VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito. Valores expressos como média ± DP (n = 7). * significativo para p < 0,05 vs. C; [†] p < 0,05 vs. R₅₀; ANOVA de uma via e teste de Tukey post hoc.

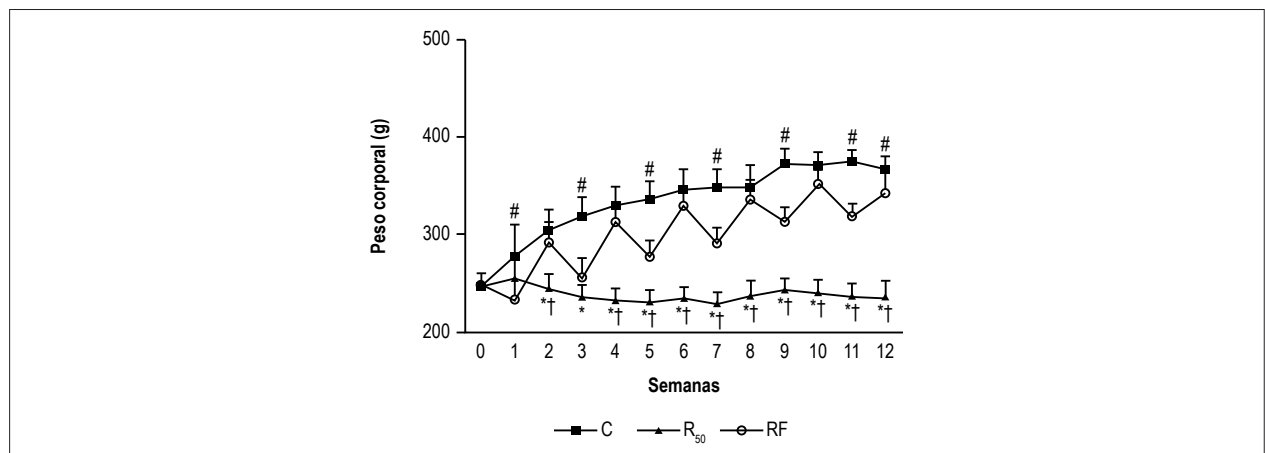


Figura 1 – Alterações do peso corporal após 90 dias de tratamento. Grupos: controle (C, quadrados, n = 7); animais submetidos a restrição alimentar de 50% (R₅₀, triângulos, n = 7); e animais submetidos a alternância de restrição alimentar de 50% e realimentação (RF, círculos, n = 7). Valores expressos como média ± DP; * significativo para p < 0,05, R₅₀ vs. C; [†] p < 0,05, RF vs. R₅₀; [#] p < 0,05, C vs. RF. ANOVA de duas vias para medidas repetidas; teste de Bonferroni post hoc. Fonte: grupo de pesquisa.

grupo R₅₀ em concentração de Ca²⁺ de 5,2 mM se comparados aos do grupo RF. Quando submetidos às manobras inotrópicas, TD, PS e +dL/dt foram semelhantes nos grupos RF e R₅₀. Em relação à função cardíaca de ratos do grupo C após estimulação com Ca²⁺, aqueles submetidos a ciclos de jejum/realimentação apresentaram comportamento similar (Figuras 2A-F). O único resultado significativo entre os grupos C e R₅₀ foi observado na mais alta concentração de Ca²⁺ (5,2 mM); -dL/dt foi significativamente mais baixa no grupo R₅₀ do que no grupo C (C: 2,66 ± 0,35 vs. R₅₀: 2,18 ± 0,33 ML/s, p < 0,05) (Figura 2E).

Estimulação com isoproterenol

Os ciclos de jejum/realimentação elevaram +dT/dt, -dT/dt e -dL/dt na concentração mais alta de isoproterenol (1 μM) em comparação aos valores do grupo R₅₀, indicando um efeito inotrópico positivo nos miócitos. Em contraste, o grupo RF apresentou redução de +dL/dt em comparação

ao grupo R₅₀ para a mesma concentração de isoproterenol (Figura 3F). Além disso, efeitos similares foram observados em +dT/dt e -dT/dt a 1 μM de isoproterenol no grupo C quando comparado ao R₅₀ (Figuras 3B e C). Ademais, os ratos do grupo RF apresentaram maior +dL/dt na condição basal e concentrações de isoproterenol (0,01 μM) em comparação aos do grupo C (Figura 3F). Não houve diferença significativa nos dados mecânicos (TD e PS) sob estimulação inotrópica com isoproterenol entre os grupos (Figuras 3A e D).

Morfologia miocárdica

Os ratos do grupo C mostraram características morfológicas normais, com miofibrilas preenchendo todo o sarcoplasma, sarcômeros bem definidos, mitocôndrias com cristas lamelares, membranas sarcoplasmáticas com aspecto regular, retículo sarcoplasmático entre as miofibrilas e núcleos com cromatina não condensada (Figuras 4A e B). O grupo R₅₀ apresentou alterações focais, como desorganização ou

Tabela 3 – Contração isotônica dos grupos na condição basal

	Grupos		
	C	R ₅₀	RF
PS (%)	19 ± 3	18 ± 3	20 ± 2
-dL/dt (ML/s)	1,89 ± 0,40	1,60 ± 0,36	2,19 ± 0,45 [†]
TPS (ms)	168 ± 26	205 ± 14 [†]	161 ± 14 [†]
+dL/dT (ML/s)	4,28 ± 1,26	4,13 ± 1,11	4,79 ± 0,86
TR ₅₀ (ms)	58 ± 10	76 ± 12 [†]	53 ± 9 [†]
AS (mm ²)	0,95 ± 0,22	0,85 ± 0,17	0,91 ± 0,18

C: grupo controle; R₅₀: animais com restrição alimentar de 50%; RF: animais com alternância entre restrição alimentar de 50% e realimentação; OS: porcentagem de encurtamento; -dL/dt: velocidade máxima de encurtamento; TPS: tempo para encurtamento máximo; +dL/dt: velocidade máxima de relaxamento; TR₅₀: tempo para tensão desenvolvida decrescer 50% de seu valor máximo; AS: área seccional do músculo. Valores expressos como média ± DP (n = 7) na concentração basal de cálcio (1,25 mM); * significativo para p < 0,05 vs. C; [†] p < 0,05 vs. R₅₀; ANOVA de uma via e teste de Tukey post hoc.

Tabela 4 – Contração isométrica dos grupos na condição basal

	Grupos		
	C	R ₅₀	RF
DT (g/mm ²)	6,17 ± 1,24	6,37 ± 1,14	7,18 ± 1,20
TR (g/mm ²)	1,06 ± 0,12	1,12 ± 0,31	1,07 ± 0,17
+dT/dt (g/mm ² /s)	77 ± 17	63 ± 13	93 ± 18 [†]
TPT (ms)	146 ± 27	184 ± 19 [†]	128 ± 25 [†]
-dT/dt (g/mm ² /s)	29 ± 5	22 ± 4	33 ± 9 [†]
TR ₅₀ (ms)	174 ± 40	224 ± 32 [†]	171 ± 21 [†]
AS (mm ²)	0,95 ± 0,22	0,85 ± 0,17	0,91 ± 0,18

C: grupo controle; R₅₀: animais com restrição alimentar de 50%; RF: animais com alternância entre restrição alimentar de 50% e realimentação; TD: tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso; TPT: tempo para atingir o pico de tensão; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida; TR₅₀: tempo para tensão desenvolvida decrescer 50% de seu valor máximo; AS: área seccional do músculo. Valores expressos como média ± DP (n = 7) na concentração basal de cálcio (1,25 mM); * significativo para p < 0,05 vs. C; [†] p < 0,05 vs. R₅₀; ANOVA de uma via e teste de Tukey post hoc.

ausência de miofibrilas, algumas mitocôndrias polimórficas com número reduzido de cristas e áreas de dilatação do retículo sarcoplasmático (Figuras 4C, D e E). Nos ratos do grupo RF, a única alteração observada foi a perda das cristas mitocondriais em algumas organelas. A maioria das fibras apresentou morfologia normal (Figuras 4F e G).

Discussão

Há pouca informação disponível sobre a relação entre função e morfologia cardíacas durante jejum/realimentação em corações hipertrofiados de SHR. Nesse contexto, esse regime alimentar tornou-se assunto de considerável interesse científico para perda de peso e melhora da saúde cardiometabólica. Assim, o principal achado deste estudo foi que ciclos de jejum/realimentação atenuam o dano causado pela RC. Os resultados revelam que o ciclo jejum/realimentação apresentou elevação dos parâmetros isotônicos e isométricos na condição basal, assim como melhorou a resposta inotrópica miocárdica ao cálcio e isoproterenol. Além disso, o ciclo jejum/realimentação reduziu a atrofia cardíaca e as injúrias morfológicas.

Observou-se menor ganho de peso corporal no grupo RF do que no grupo C (Tabela 1, Figura 1), porém maior ganho de

peso corporal do que no grupo R₅₀. De acordo com a literatura, ocorre redução de cerca de 13% do peso corporal quando os animais são submetidos a 48 horas de jejum.²⁵ Esse resultado parece ser mediado por hormônios, como leptina que regula o apetite e o ganho de corporal. Uma rápida inibição da expressão do gene *ob* no tecido adiposo branco ocorre no jejum, e tal efeito pode ser revertido pela realimentação.^{25,26}

Hipertrofia cardíaca, um importante processo patológico envolvido no remodelamento cardíaco, serve inicialmente como um mecanismo compensatório para preservar o débito cardíaco.²⁷ O remodelamento cardíaco pode ser considerado o primeiro passo na sequência de respostas adaptativas do coração ao estresse causado por um grande número de condições fisiológicas e patológicas, como alterações de cargas de volume e pressão e/ou alterações metabólicas.²⁸ Um estudo recente revelou que o ciclo jejum/realimentação induziu atrofia cardíaca visualizada como uma redução do coração como um todo e do ventrículo esquerdo, assim como da relação VE/PCF. A diminuição do peso do ventrículo esquerdo em relação ao peso corporal é muito comum em pequenos animais submetidos a restrição alimentar²² e jejum/realimentação.²⁹ Inibição da síntese proteica miocárdica

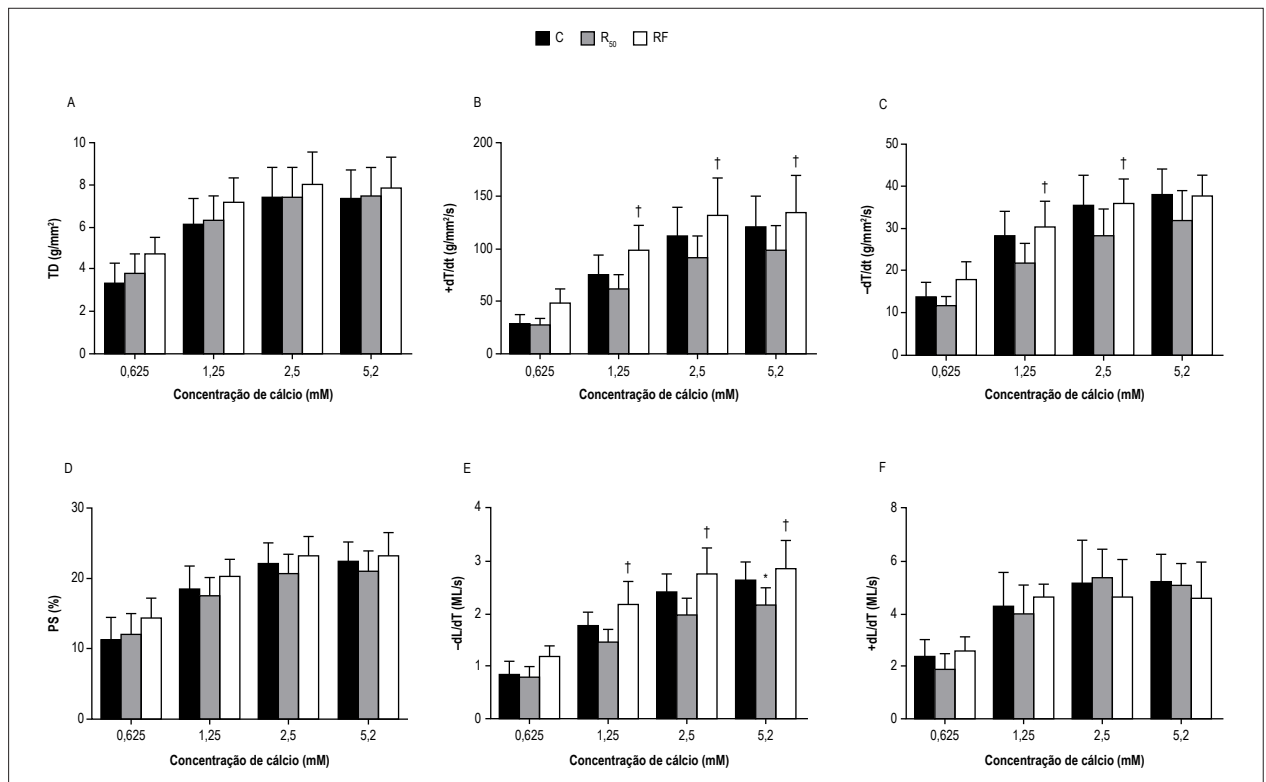


Figura 2 – Efeitos do aumento do cálcio extracelular nos parâmetros miocárdicos isotônicos e isométricos nos músculos papilares do grupo controle (C = barras pretas), de animais com restrição alimentar de 50% (R₅₀ = barras de cor cinza) e de animais submetidos a alternância de restrição alimentar de 50% e realimentação (RF = barras brancas). Experimento do cálcio extracelular: 7 animais em cada grupo. Parâmetros isométricos: A: TD (tensão desenvolvida normalizada para área seccional); B: +dT/dt, g/mm²/s (velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida normalizada para área seccional); C: -dT/dt, g/mm²/s (velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida normalizada para área seccional). Parâmetros isotônicos: D: PS (porcentagem de encurtamento); E: -dL/dT (velocidade máxima de encurtamento); F: +dL/dT (velocidade máxima de relaxamento). L_{max}: comprimento muscular no pico de TD. Valores expressos como média ± DP; * significativo para p < 0,05 vs. C; † p < 0,05 vs. R₅₀. ANOVA de duas vias para medidas repetidas e teste de Tukey post hoc. Fonte: grupo de pesquisa.

e redução na meia-vida média de proteínas são possíveis explicações para a reduzida massa cardíaca na inanição.³⁰ A síntese proteica, um processo anabólico, é necessária para a hipertrofia cardíaca. Duas importantes vias reguladoras da síntese proteica são inibidas pela AMPK, um regulador primário das vias metabólicas, que desempenha papel essencial em uma ampla variedade de processos celulares de proteção contra hipertrofia cardíaca.³¹ Logo, atrofia cardíaca poderia ser regulada pela via de sinalização comum da AMPK no hipotálamo.

Na análise ultraestrutural, a restrição alimentar causou dano morfológico focal na maioria das fibras dos músculos papilares. As mesmas alterações foram menos intensas na condição de realimentação intermitente. Tal condição parece auxiliar na atenuação dos mecanismos responsáveis por esse dano e atuar através da melhora do anabolismo proteico e retardo da degradação proteica. Achados recentes sugerem que os efeitos benéficos da realimentação resultam de redução na injúria oxidativa e aumento da resistência celular ao estresse.^{2,32} Um possível mecanismo para o nosso resultado pode estar ligado à expressão de atrogina-1, uma E3 ubiquitina-ligase, também conhecida como MAFbx (*muscle atrophy F-box*). As E3-ligasas são parte do sistema ubiquitina-proteassoma

utilizado para degradação proteica durante atrofia muscular. A literatura mostra que a expressão de atrogina-1/MAFbx resulta em atrofia muscular durante condição catabólica.³³ No músculo cardíaco, a expressão de atrogina-1/MAFbx aumenta na insuficiência cardíaca e sobrecarga de pressão.^{33,34}

A análise do músculo papilar isolado mostrou que a restrição alimentar promove disfunção cardíaca, mas a realimentação previne essa situação. Tais estímulos evidenciam que a melhora da função miocárdica atribuída a ciclos de jejum/realimentação relaciona-se a alterações no trânsito do Ca²⁺ intracelular, em especial na recaptura e/ou extrusão do Ca²⁺ citosólico, e sistema beta-adrenérgico. Entretanto, a menor resposta dos ratos privados de alimento ao aumento da concentração de Ca²⁺ extracelular pode estar relacionada com alterações nos mecanismos gerais do ciclo do Ca²⁺, como trocador de Na⁺/Ca²⁺ sarcolemal, canal de Ca²⁺ do tipo L sarcolemal, retículo sarcoplasmático, receptor de rianodina, bomba de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático e sensibilidade dos miofilamentos ao Ca²⁺.³⁵ Em relação aos ciclos de jejum/realimentação, esse processo pode ser mais rápido e equilibrado, mas não foram encontrados estudos que confirme essa afirmação nem demonstre a atividade e a expressão das proteínas reguladoras do trânsito do Ca²⁺.

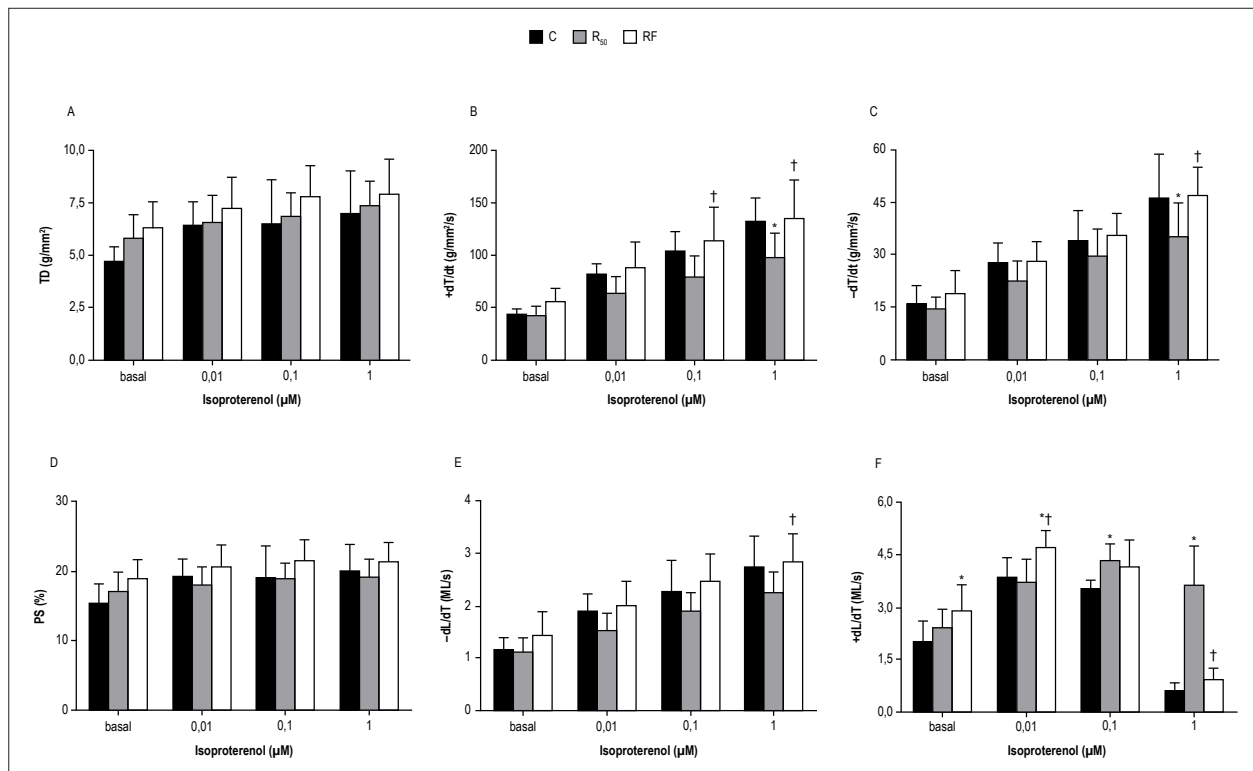


Figura 3 – Efeitos do estímulo com isoproterenol na função miocárdica nos músculos papilares do grupo controle (C = barras pretas), de animais com restrição alimentar de 50% (R₅₀ = barras de cor cinza) e de animais submetidos a alternância de restrição alimentar de 50% e realimentação (RF = barras brancas). Experimento de estímulo com isoproterenol: 7 animais em cada grupo. Parâmetros isométricos: A: TD (tensão desenvolvida normalizada para área seccional); B: +dT/dt, g/mm²/s (velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida normalizada para área seccional); C: -dT/dt, g/mm²/s (velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida normalizada para área seccional). Parâmetros isotônicos: D: PS (porcentagem de encurtamento); E: -dL/dt (velocidade máxima de encurtamento); F: +dL/dt (velocidade máxima de relaxamento). L_{max}: comprimento muscular no pico de TD. Valores expressos como média ± DP; * significativo para p < 0,05 vs. C; † p < 0,05 vs. R₅₀. ANOVA de duas vias para medidas repetidas e teste de Tukey post hoc. Fonte: grupo de pesquisa.

Outra explicação poderia estar relacionada ao papel da citocina na cardioproteção mediada pelo jejum intermitente. O influxo de células inflamatórias e a produção de mediadores pró-inflamatórios contribuem para a injúria miocárdica.³⁶ Entretanto, a adiponectina pode proteger as células miocárdicas contra a injúria isquêmica ao ativar a via da proteína quinase dependente de AMP cíclico – via Akt, sendo a última parcialmente mediada por restrição calórica.³⁷ Assim, os efeitos benéficos de ciclos de jejum/realimentação podem funcionar através das vias das citocinas anti-inflamatórias.

Poucos estudos avaliaram os componentes beta-adrenérgicos em modelos experimentais de jejum/realimentação.^{25,35} Alguns estudos mostraram que o comprometimento da função cardíaca está relacionado às alterações do sistema beta-adrenérgico,³⁵ enquanto outros não relataram redução da resposta beta-adrenérgica.²⁵ A diminuição no número de beta-receptores cardíacos foi mostrada em vários modelos de hipertensão conhecidos por sua associação com uma elevação na atividade nervosa simpática, incluindo SHR.³⁸ Assim, a associação entre elevação da atividade simpática e infrarregulação de beta-receptores cardíacos é próxima o suficiente para sugerir que a redução no número de beta-receptores após privação alimentar e realimentação indica persistente aumento da atividade simpática cardíaca.

No entanto, neste estudo, não houve dano do sistema beta-adrenérgico nos ratos do grupo RF, pois a função cardíaca foi similar àquela do grupo C. Esses dados tendem a embasar a hipótese de que a estimulação com isoproterenol preserva o sistema beta-adrenérgico e a fosforilação do AMP-cíclico de proteínas relacionadas ao trânsito do Ca²⁺ nos ratos realimentados.

Os ciclos de jejum/realimentação tornaram-se tema de considerável interesse científico como uma abordagem dietética potencial para perda de peso corporal e aperfeiçoamento da saúde cardiometabólica. Os efeitos benéficos do jejum intermitente resultam de pelo menos dois mecanismos: estresse oxidativo e hipótese de resistência ao estresse.³⁹ De acordo com a literatura, durante jejum intermitente, há menor produção de radicais livres nas mitocôndrias e, conseqüentemente, menor dano oxidativo para as células.³⁹ Outra hipótese é a resistência ao estresse, associada com a elevação da resistência de células de diferentes tecidos à injúria induzida pelos insultos oxidativos, genotóxicos e metabólicos. A conservação da resistência ao estresse em resposta ao jejum intermitente em uma variedade de espécies fornece forte evidência de que esse mecanismo, no caso da restrição alimentar, contribua para prolongar a vida.³⁹

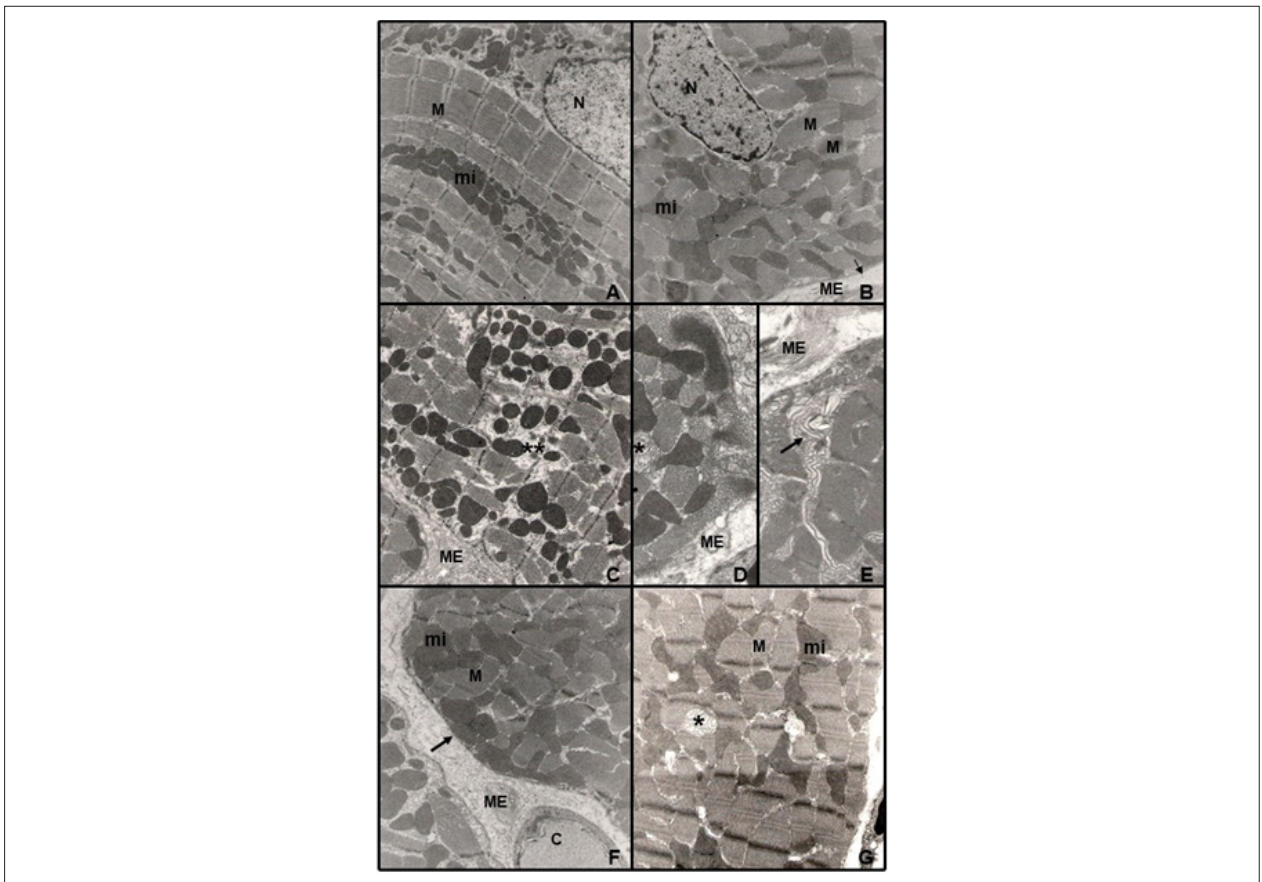


Figura 4 – Estudo ultraestrutural do músculo papilar do ventrículo esquerdo ($n = 3$ por grupo). Fotos A e B correspondem ao grupo controle, fotos C, D e E ao grupo com restrição alimentar (R_{30}) e fotos F e G ao grupo de realimentação (RF). O grupo controle apresentou preservação da ultraestrutura com miofibrilas (M), retículo sarcoplasmático (ponta da seta), mitocôndria (mi), membrana nuclear (N) e membrana plasmática (seta) normais. Os ratos do grupo R_{30} mostraram alterações celulares, como mitocôndrias polimórficas (*), desorganização miofibrilar (**) e pregueamento da membrana plasmática (seta). Durante realimentação, o músculo papilar mostrou preservação de miofibrilas (M), mitocôndrias (mi) e membranas plasmáticas (seta), mitocôndrias polimórficas (*) e capilar (C). Fonte: grupo de pesquisa.

É importante notar que, conforme estudos em roedores e seres humanos, a restrição alimentar intermitente pode promover perda de peso e/ou influenciar favoravelmente vários índices de saúde cardiometabólica, com eficácia igual ou superior à de abordagens convencionais de restrição energética contínua, como a restrição alimentar.²⁹ Os ciclos de jejum/realimentação aumentam a tolerância cardíaca à injúria isquêmica e podem afetar o desenvolvimento de doença cardiovascular, evitando o remodelamento cardíaco pós-infarto e a iminente insuficiência cardíaca crônica.²⁹ Comparando-se as duas abordagens dietéticas, alguns estudos mostraram que a restrição calórica pode exercer seus efeitos benéficos primariamente através da redução do estresse oxidativo, enquanto que os ciclos de jejum/realimentação podem atuar primariamente através do mecanismo de resistência ao estresse,⁴⁰ que pode ter efeito cardioprotetor.

Limitações do estudo

Este estudo não investigou a atividade e a expressão das proteínas reguladoras do trânsito de Ca^{2+} conhecidas por afetar a contração e o relaxamento miocárdico. Além disso, este estudo não avaliou o envolvimento das

citocinas anti-inflamatórias, a produção de radicais livres e a resposta celular ao estresse, que poderiam auxiliar a consolidar os efeitos benéficos do jejum intermitente.

Conclusão

Ciclos de jejum/realimentação promovem efeitos benéficos cardíacos e atenuam o dano miocárdico causado por RC em SHR, contribuindo para reduzir o risco cardiovascular e os prejuízos morfológicos. Além disso, o ciclo de jejum/realimentação promove leve melhora do trânsito do Ca^{2+} e do sistema beta-adrenérgico.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Pinotti MF, Cicogna AC, Leopoldo AS; Obtenção de dados: Pinotti MF, Matias AM, Sugizaki MM, Nascimento AF, Pai MD, Leopoldo APL; Análise e interpretação dos dados: Pinotti MF, Sugizaki MM, Nascimento AF, Pai MD, Leopoldo APL; Análise estatística: Sugizaki MM, Nascimento AF, Pai MD, Leopoldo APL; Obtenção de financiamento: Cicogna AC; Redação do manuscrito: Pinotti MF, Matias AM, Cicogna AC, Leopoldo AS; Revisão crítica

do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Matias AM, Pai MD, Leopoldo APL, Cicogna AC, Leopoldo AS.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPESP número 04/04654-6.

Vinculação acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP sob o número de protocolo 439/2004.

Referências

1. World Health Organization. (WHO). Noncommunicable doenças WHO. [Cited in 2016 Sep 26]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/en/>
2. Han X, Turdi S, Hu N, Guo R, Zhang Y, Ren J. Influence of long-term caloric restriction on myocardial and cardiomyocyte contractile function and autophagy in mice. *J Nutr Biochem*. 2012;23(12):1592-9.
3. Martin B, Mattson MP, Maudsley S. Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging. *Ageing Res Rev*. 2006;5(3):332-53.
4. Dolinsky VW, Morton JS, Oka T, Robillard-Frayne I, Bagdan M, Lopaschuk GD, et al. Calorie restriction prevents hypertension and cardiac hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 2010;56(3):412-21.
5. Keenan KP, Laroque P, Ballam GC, Ballam GC, Soper KA, Dixit R, et al. The effects of diet, ad libitum overfeeding, and moderate dietary restriction on the rodent bioassay: the uncontrolled variable in safety assessment. *Toxicol Pathol*. 1996;24(6):757-68.
6. Cicogna AC, Padovani CR, Okoshi K, Aragon FF, Okoshi MP. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. *Am J Med Sci*. 2000;320(4):244-8.
7. Haddad F, Bodel PW, McCue SA, Herrick PE, Baldwin KM. Food restriction-induced transformations in cardiac functional and biochemical properties in rats. *J Appl Physiol* (1985). 1993;74(2):606-12.
8. Melo DS, Costa-Pereira LV, Santos CS, Mendes BF, Costa KB, Santos CF, et al. Severe calorie restriction reduces cardiometabolic risk factors and protects rat hearts from ischemia/reperfusion injury. *Front Physiol*. 2016 Apr 8;7:106.
9. Okoshi K, Matsubara LS, Okoshi MP, Cicogna AC, Fioretto JR, Padovani CR, et al. Food restriction-induced myocardial dysfunction demonstrated by the combination of in vivo and in vitro studies. *Nutr Res*. 2002;22(11):1353-64.
10. Cicogna AC, Padovani CR, Okoshi K, Matsubara LS, Aragon FF, Okoshi MP. The influence of temporal food restriction on the performance of isolated cardiac muscle. *Nutr Res*. 2001;21(4):639-48.
11. Gut AL, Okoshi MP, Padovani CR, Aragon FF, Cicogna AC. Myocardial dysfunction induced by food restriction is related to calcium cycling and beta-adrenergic system changes. *Nutr Res*. 2003;23(7):911-9.
12. Okoshi MP, Okoshi K, Pai VD, Pai-Silva MD, Matsubara LS, Cicogna AC. Mechanical, biochemical, and morphological changes in the heart from chronic food-restricted rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2001;79(9):754-60.
13. Ahmet I, Wan R, Mattson M, Lakatta EG, Talan MI. Chronic alternate-day fasting results in reduced diastolic compliance and diminished systolic reserve in rats. *J Card Fail*. 2010;16(10): 843-53.
14. Longo VD, Mattson PM. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab*. 2014;19(2):181-92.
15. Fann DY, Ng GY, Poh L, Arumugam TV. Positive effects of intermittent fasting in ischemic stroke. *Exp Gerontol*. 2017 Mar;89:93-102.
16. Snorek M, Hodyc D, Sedivý V, Durišová J, Skoumalová A, Wilhelm J, et al. Short-term fasting reduces the extent of myocardial infarction and incidence of reperfusion arrhythmias in rats. *Physiol Res*. 2012;61(6):567-74.
17. Wiggins JE, Goyal M, Sanden SK, Wharram BL, Shedden KA, Misk DE, et al. Podocyte hypertrophy, "adaptation," and "decompensation" associated with glomerular enlargement and glomerulosclerosis in the aging rat: prevention by calorie restriction. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(10):2953-66.
18. Gouw AM, Efe G, Barakat R, Preecha A, Mehdizadeh M, Garan AS, et al. Roles of estrogen receptor-alpha in mediating life span: the hypothalamic deregulation hypothesis. *Physiol Genomics*. 2017;49(2):88-95.
19. Winter TA, O'Keefe SJ, Callanan M, Marks T. The effect of severe undernutrition and subsequent refeeding on the whole-body metabolism and protein synthesis in human subjects. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2005;29:221-8.
20. Ševela S, Novák F, Kazda A, Brodská H. [Refeeding syndrome]. *Cas Lek Cesk*. 2016;155(2):34-40.
21. Young EA, Cantu TL, Harris MM. Gastrointestinal and cardiac response to refeeding after low-calorie semistarvation. *Am J Clin Nutr*. 1989;50(5):922-9.
22. Ameredes BT, Daoud MJ, Watchko JF. Refeeding reverses cardiac myosin shifts induced by undernutrition in aged rats: modulation by growth hormone. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30(8):1525-33.
23. Freund HR, Holroyde J. Cardiac function during protein malnutrition and refeeding in the isolated rat heart. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1986;10(5):470-3.
24. Pinotti MF, Leopoldo AS, Silva MD, Sugizaki MM, do Nascimento AF, Lima-Leopoldo AP, et al. A comparative study of myocardial function and morphology during fasting/refeeding and food restriction in rats. *Cardiovasc Pathol*. 2010;19(5):175-82.
25. Pinotti MF, Silva MD, Sugizaki MM, Diniz YS, Sant'Ana LS, Aragon FF, et al. Effect of unsaturated fatty acids on myocardial performance, metabolism and morphology. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39(2):305-12.
26. Trayhurn P, Thomas ME, Duncan JS, Rayner DV. Effects of fasting and refeeding on *ob* gene-expression in white adipose-tissue of lean and obese (*ob/ob*) mice. *FEBS Lett*. 1995;368(3):488-90.
27. Tham YK, Bernardo BC, Ooi JY, Weeks KL, McMullen, JR. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol*. 2015;89(9):1401-38.
28. Wu QQ, Xiao Y, Yuan Y, Ma ZG, Liao HH, Liu C, et al. Mechanisms contributing to cardiac remodeling. *Clin Sci (Lond)*. 2017;131(18):2319-45.

29. Lee SR, Ko TH, Kim HK, Marquez J, Ko KS, Rhee BD, et al. Influence of starvation on heart contractility and corticosterone level in rats. *Pflugers Arch.* 2015;467(11):2351-60.
30. Samarel AM, Parmacek MS, Magid NM, Decker RS, Lesch M. Protein synthesis and degradation during starvation-induced cardiac atrophy in rabbits. *Circ Res.* 1987;60(6):933-41.
31. Feng Y, Zhang Y, Xiao H. AMPK and cardiac remodeling. *Sci China Life Sci.* 2018;61(1):14-23.
32. Mattson MP, Longo VD, Harvie M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Res Rev.* 2017 Oct;39:46-58.
33. Carvalho RF, Castan EP, Coelho CA, Lopes FS, Almeida FL, Michelin A, et al. Heart failure increases atrogen-1 and MuRF1 gene expression in skeletal muscle with fiber type-specific atrophy. *J Mol Histol.* 2010;41(1):81-7.
34. Razeghi P, Baskin KK, Sharma S, Young ME, Stepkowski S, Essop MF, et al. Atrophy, hypertrophy, and hypoxemia induce transcriptional regulators of the ubiquitin proteasome system in the rat heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;342(2):361-4.
35. Gut AL, Sugizaki MM, Okoshi MP, Carvalho RF, Pai-Silva MD, Aragon FF, et al. Food restriction impairs myocardial inotropic response to calcium and beta-adrenergic stimulation in spontaneously hypertensive rats. *Nutr Res.* 2008;28(10):722-7.
36. Souza Junior AL, Malfitano C, Figueroa D, de Souza LE, Ignotti E, Irigoyen MC, et al. Effect of fasting and refeeding on the consequences of myocardial infarction in rats. *Integr Mol Med.* 2015;31(1):478-83.
37. Dogan S, Ray A, Cleary MP. The influence of different calorie restriction protocols on serum pro-inflammatory cytokines, adipokines and IGF-I levels in female C57BL6 mice: short term and long term diet effects. *Meta Gene.* 2017 Jun;12:22-32.
38. Stiles GL, Lefkowitz RJ. Cardiac adrenergic receptors. *Ann Rev Med.* 1984;35:149-64.
39. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* 1996;273(5271):59-63.
40. Mattson MP. Energy intake, meal frequency and health: a neurobiological perspective. *Annu Rev Nutr.* 2005;25:237-60.

