

EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA SOBRE A HISTOMORFOMETRIA DA AORTA TORÁCICA DE RATOS ENVELHECIDOS

Pedro Luis Lostoza

Graduado em Medicina pela Universidade Estadual de Maringá, Maringá (PR), Brasil.

Josiane Medeiros de Mello

Professora doutora de anatomia do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá (PR), Brasil.

Maria Raquel Marçal Natali

Professora doutora de histologia do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá (PR), Brasil.

Célia Regina Godoy Gomes

Professora doutora de anatomia do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá (PR), Brasil.

E-mail: crggomes@uem.br

RESUMO: O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da restrição calórica sobre a morfologia da aorta torácica em ratos envelhecidos e, a partir dessa análise, inferir sobre a capacidade dessa intervenção em reprimir as alterações histológicas observáveis no transcorrer cronológico. Foram utilizados 41 ratos Wistar machos brancos divididos em 7 grupos: controles (Co) 7, 12, 18 e 23 meses e restrição calórica (Rc) 12, 18 e 23 meses. Os ratos foram sacrificados e as aortas coletadas e fixadas em formol 10%. As peças passaram pela rotina histológica, com inclusão em parafina seguida por cortes de 6 μm , os quais foram corados pela orseína-picrosirius-hematoxilina e tricrômico de Masson. A estatística foi feita pela análise de variância de um fator (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para nível de significância de 5%. Os resultados revelaram menor peso corporal e menor espessura íntima-média nos grupos de restrição calórica em relação aos controles. A eficácia da restrição calórica em deter as alterações do envelhecimento somente foi evidenciada até 18 meses de idade, não diferindo entre os grupos controle e de restrição calórica. Infere-se, portanto, um limite etário para os possíveis efeitos atenuadores da restrição calórica sobre as alterações da senescências na parede arterial.

PALAVRAS-CHAVE: Aorta Torácica, Envelhecimento, Restrição Calórica.

EFFECT OF CALORIE RESTRICTION ON THORACIC AORTA HISTOMORPHOMETRY OF AGED RATS

ABSTRACT: The purpose of this study was to assess the effects of the calorie restriction on thoracic aorta morphology in aged rats, and, from this analysis, infer the capacity of this intervention to reduce measurable histological changes in the course of time. It was used 41 white male Wistar rats that were separated into 7 groups: control (Co) 7, 12, 18 and 23 months and calorie restriction (Rc) 12, 18 and 23 months. The rats were sacrificed and their aortas were collected and fixed in 10% formalin. The aortas were prepared through the histological routine techniques, with inclusion in paraffin followed by cuts of 6 μm , which were stained with orcein-picrosirius-hematoxylin and Masson's trichrome. The statistic was made through analysis of variance (ANOVA) and the Tukey's test were employed at 5% significance. The results shown lower body weight and lower intima-media thickness in the calorie restriction group compared to control groups. The effectiveness of calorie restriction in reducing the aging changes only was observed up to 18 months, with no significant difference between the control and calorie restriction groups. Therefore, it is concluded that there is an age limit for the possible attenuating effects of the calorie restriction on changes of senescence in the arterial wall.

KEY WORDS: Thoracic aorta; Aging; Calorie Restriction.

INTRODUÇÃO

O envelhecimento pode ser definido como uma incapacidade tempo-dependente dos seres vivos em manter suas funções orgânicas plenas, propiciando o surgimento de diversos processos patológicos, os quais conduzem os indivíduos à morte (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013). Em parte esse déficit de desempenho pode ser atribuído às alterações hemodinâmicas advindas da senescência vascular arterial, a qual incorre na deterioração estrutural e conseqüentemente de performance desses vasos (DANTAS; JIMÉNEZ-ALTAYÓ, 2012). Esse envelhecimento vascular é descrito como um processo gradual abrangendo alterações bioquímicas, enzimáticas e celulares nas artérias, bem como modificações dos sinais que as modulam (EL ASSAR et al., 2012).

Embora a senescência esteja intrinsicamente ligada ao transcorrer cronológico, os organismos reagem de formas distintas ao seu amadurecimento. Pesquisas biomédicas são realizadas no intento de compreender essas variações interindividuais e aplicar esse conhecimento em formas de retardar as alterações da senescência. Nesse contexto, a restrição calórica permanece como uma das poucas alternativas da ciência, com comprovação satisfatória, para estender o tempo de vida em uma variedade de espécies, inclusive seres humanos (GENARO; SARKIS; MARTINI, 2009).

McCay, Crowell e Maynard (1935) observaram que o tempo de vida de ratos em laboratório era aumentado quando submetidos a uma dieta com restrição calórica. Weindruch e Walford (1982) realizaram, em roedores com seis meses de idade, a redução do consumo calórico de 30% e 60% em relação ao *ad libitum*, observando que tal feito prolongou o tempo de vida do grupo experimental proporcionalmente a 30% e 60%, respectivamente. Já ratos com 12 meses de idade cuja restrição calórica limitou-se a 44%, tiveram um incremento do intervalo de vida entre 10% e 20%.

A elucidação dos mecanismos pelos quais uma dieta com restrição calórica prolonga a duração da vida é inconclusa. Há fortes indícios que apontam uma redução na produção de espécies reativas de oxigênio produzidas na mitocôndria durante o metabolismo energético, as quais seriam responsáveis por um estado celular de

estresse oxidativo implicado no envelhecimento precoce (SOHAL et al., 1994). Outra hipótese pauta-se em uma otimização endócrino-metabólica, pois, em restrição calórica, há uma redução de tecido adiposo e uma melhoria da sinalização insulínica (KOUBOVA; GUARENTE, 2003).

A restrição calórica é definida como uma redução da ingestão calórica, ou seja, uma quantidade de calorias inferior ao *ad libitum*, sem, contudo, proceder em desnutrição (ROTH; INGRAM; LANE, 2001). A restrição calórica demonstrou, para diversas espécies animais, uma redução da incidência de doenças relacionadas ao avanço da idade, a exemplo de doenças cardiovasculares, câncer, e diabetes (WEINDRUCH; SOHAL, 1997), embora, sua atuação em humanos aguardar por estudos conclusivos, os quais demonstrem a efetividade na expansão do tempo de vida (HEILBRONN; RAVUSSIN, 2003).

O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da restrição calórica sobre a morfologia da aorta torácica em ratos envelhecidos e, a partir dessa análise, inferir sobre a capacidade dessa intervenção em refrear as alterações histológicas observáveis no transcorrer cronológico.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para este experimento foram utilizados segmentos da aorta torácica de 41 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos com 7, 12, 18 e 24 meses de idade, os quais foram mantidos em caixas de polipropileno (quatro animais por caixa) com iluminação de claro e escuro de 12 horas e temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, sendo estes distribuídos em grupos distintos de acordo com a quantidade de alimento recebida:

Grupos Controles:

- GRUPO C7: (ratos controles com 7 meses de idade alimentados *ad libitum*)
- GRUPO C12: (ratos controles com 12 meses de idade alimentados *ad libitum*)
- GRUPO C18: (ratos controles com 18 meses de idade alimentados *ad libitum*)
- GRUPO C23: (ratos controles com 23 meses de idade alimentados *ad libitum*)

Grupo Experimental:

- GRUPO RC12: (ratos submetidos à restrição calórica dos 7 aos 12 meses de idade)
- GRUPO RC18: (ratos submetidos à restrição calórica dos 7 aos 18 meses de idade)
- GRUPO RC23: (ratos submetidos à restrição calórica dos 7 aos 23 meses de idade)

Os procedimentos experimentais usados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (Parecer nº 067/2009).

Os grupos controles foram alimentados *ad libitum* com ração padrão para roedores NUVILAB-NUVITAL[®] com nível de proteínas de 22%, sendo a quantidade de ração consumida controlada durante duas semanas a partir dos 6 meses de vida. Este controle consistiu em oferecer 100 gramas diárias de ração para cada animal e pesagem das sobras, obtendo, desta forma, o consumo diário dos animais. No grupo experimental, os animais receberam, a partir dos 7 meses de idade, metade da média da ingestão calórica diária dos ratos alimentados *ad libitum* – grupo submetido à restrição calórica –, sendo sacrificados aos 12 meses de vida. O peso corporal dos animais foi verificado quinzenalmente e o consumo da ração foi controlado por uma semana/mês.

Os animais foram pesados e anestesiados intraperitonealmente com tiopental sódico (Thionembital[®]) (40mg/kg do peso corporal). O tórax foi aberto e a aorta torácica foi retirada e fixada em formalina por 48 horas. Em seguida, foram desidratadas em sequência crescente de etanol (80%, 90%, absoluto I, II, III) e diafanizadas em xilol. Todas as peças foram incluídas em parafina. Em seguida, realizaram-se cortes histológicos transversais com 6 mm de espessura no aparelho Micrótomo (Leica RM 2145). Em sequência, foram desparafinadas pela série de xilóis (I, II, III) e hidratadas pela série de alcoóis (absoluto I, II e III, 90%, 80% e 70%).

Os cortes foram corados através dos métodos de Tricrômico de Masson e Orceína-picrosírius-hematoxilina. A orceína utilizada foi a TAENZER-UNA com modificação de ROMAIS (BEHMER; TOLOSA; FREITAS NETO, 1976).

Para a morfometria da parede da aorta torácica,

efetuou-se a medida íntima-média, onde se examinou quatro regiões diferentes de um mesmo corte diametralmente opostas para maior precisão do estudo.

A quantificação foi feita na túnica média da aorta torácica. Para a descrição do estudo empregou-se a densidade de volume (Vv) (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995) do colágeno, do elástico e do músculo liso na túnica média da aorta torácica. Para cada animal foram estudados 9 cortes histológicos em um campo microscópico aleatório. A contagem de pontos procedeu-se através de um sistema-teste com 36 pontos, totalizando 324 pontos (BADDELEY; GUNDERSEN; CRUZ-ORIVE, 1986; GUNDERSEN, 1988).

A análise microscópica foi realizada em sistema de vídeo-microscópio (microscópio Olympus Bx 50 acoplado a um sistema de captura de imagem – software Image Pro Plus) através de objetivas de 10, 20 e 40x.

Para a análise estatística realizou a análise de variância de um fator (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS

A análise ao microscópio de luz em seções transversas da aorta torácica (Figuras 1 a 3) mostrou o componente elástico na túnica média composto por 6 a 8 lâminas elásticas concêntricas orientadas em direção paralela e arranjadas cilíndricamente ao redor da luz do vaso, vistas desde a íntima até a adventícia, e entre essas lâminas observamos lamínulas elásticas unindo-as.

As lâminas elásticas apresentavam-se em camadas alternadas com células musculares lisas e em ambos os lados das lâminas elásticas estavam dispostas fibras colágenas.

Nos grupos controle de 12, 18 e 23 meses foram observados espessamentos da túnica íntima e em alguns pontos estavam presentes duplicação da lâmina elástica interna. Este espessamento estava mais acentuado (maior área) nos animais do grupo de 23 meses controle, como também a desintegração das lâminas elásticas.

O peso corporal final e a espessura íntima-média estão apresentados na Tabela 1. O peso corporal foi maior no grupo Co 18 (511,00 ± 19,79) e menor no grupo RC 23

(299,83 ± 23,25). Não houve diferença estatística entre as médias de peso corporal dos grupos controle. O grupos Co 7 (489,50 ± 19,51), Co 18 (511,00 ± 19,79) e Co 23 (510,33 ± 17,15) apresentaram significativamente maior peso corporal em relação a todos os grupos de restrição calórica. Entretanto, o grupo Co 12 (492,92 ± 9,68g) não diferiu significativamente dos grupos de restrição calórica. Quando os grupos de restrição calórica foram comparados entre si, houve diferença significativa entre os grupos RC 12 (358,50 ± 11,29g) e RC 23 (299,83 ± 23,25g).

Os resultados relativos à média de espessura íntima-média apontaram a maior medida como pertencente ao grupo Co 23 (132,64 ± 13,67 μm), sendo esta significativamente maior em relação aos grupos RC 12 (103,26 ± 12,43 μm), Co 12 (109,97 ± 8,34 μm) e RC 23 (111,49 ± 4,97 μm).

Tabela 1. Média e desvio-padrão do peso corporal e da espessura íntima-média da aorta torácica dos grupos controle (Co 7, Co 12, Co 18, Co 23) e restrição calórica (Rc 12, Rc 18, Rc 23)

Grupos	Peso corporal final (g)	Média de espessura (μm)
Co 7	489,50 ± 19,51 ^a	114,33 ± 3,44
Co 12	492,92 ± 9,68	109,97 ± 8,34 ^c
Co 18	511,00 ± 19,79 ^a	118,12 ± 13,32
Co 23	510,33 ± 17,15 ^a	132,64 ± 13,67 ^c
Rc 12	358,50 ± 11,29 ^{ab}	103,26 ± 12,43 ^c
Rc 18	326,17 ± 19,61 ^a	114,59 ± 21,40
Rc 23	299,83 ± 23,25 ^{ab}	111,49 ± 4,97 ^c

a: O grupos Co 7, Co 18 e Co 23 apresentaram significativamente maior peso corporal em comparação a todos os grupos de restrição calórica.

b: Redução ponderal significativa do RC 23 em relação ao grupo RC 12.

c: Média de espessura íntima-média estatisticamente maior em Co 23 em comparação a Co 12 e Co 23.

Os dados obtidos pela análise estereológica da túnica média da aorta torácica são apresentados na Tabela 2. A densidade de volume (Vv) do componente elástico entre os grupos controle foi significativamente menor no grupo Co 23 (27,33 ± 3,81) em relação aos grupos Co 7 (40,5 ± 6,10) e Co 18 (36,67 ± 2,13). Quando confrontados os grupos controle e de restrição calórica, verificou-se quantidade significativamente menor de componente elástico no grupo Co 23 (27,33 ± 3,81) em comparação aos grupos RC 12 (38,17 ± 2,34) e RC 18 (35,83 ± 6,36).

Em relação ao conteúdo muscular liso, as análises entre os grupos controle distinguiram significativamente uma menor quantidade desse componente no grupo Co 23 (27,67 ± 6,10) em comparação com os demais grupos controle (Tabela 2). A comparação entre os grupos controle e de restrição calórica demonstrou diferença significativa entre o grupo RC 23 (27,75 ± 3,34) e os grupos Co 7 (40,67 ± 3,54), Co 12 (43,17 ± 2,54), Co 18 (41,67 ± 5,22), mas não em relação ao grupo Co 23 (27,75 ± 3,34).

No que concerne ao componente colágeno, o exame estatístico, quando direcionado aos grupos controle entre si, atestou um aumento significativo do grupo Co 23 (43,67 ± 3,59) comparado aos demais grupos controle. Em uma comparação entre todos os grupos, observou-se uma menor densidade de volume (Vv) no grupo RC 18 (27,83 ± 9,04), sendo este valor significativamente menor em relação aos grupos Co 23 (43,67 ± 3,59) e RC 23 (42,00 ± 2,45) (Tabela 2).

Tabela 2. Média e desvio-padrão da densidade de volume (Vv) do componente elástico, muscular liso e colágeno da aorta torácica dos grupos controle (Co 7, Co 12, Co 18, Co 23) e restrição calórica (Rc 12, Rc 18, Rc 23)

GRUPOS	Vv ELÁSTICO (%)	Vv MUSCULAR LISO (%)	Vv COLÁGENO (%)
Co 7	40,5 ± 6,10 ^a	40,67 ± 3,54 ^{c,d}	31,5 ± 5,85 ^f
Co 12	35,67 ± 7,34	43,17 ± 2,54 ^{c,d}	33,5 ± 4,82 ^f
Co 18	36,67 ± 2,13 ^a	41,67 ± 5,22 ^{c,d,e}	32,00 ± 4,00 ^f
Co 23	27,33 ± 3,81 ^{ab}	27,67 ± 6,10 ^{c,e}	43,67 ± 3,59 ^g
RC 12	38,17 ± 2,34 ^b	36,50 ± 8,96	33,33 ± 6,13
RC 18	35,83 ± 6,36 ^b	40,83 ± 8,25	27,83 ± 9,04 ^g
RC 23	42,00 ± 1,87	27,75 ± 3,34 ^{d,e}	42,00 ± 2,45 ^g

a: Menor quantidade de componente elástico em Co 23, em relação aos grupos Co 7 e Co 18

b: Quantidade significativamente menor de componente elástico no grupo Co 23 em comparação aos grupos RC 12 e RC 18. Não houve discrepância estatisticamente observável em relação ao grupo RC 23

c: Menor quantidade de elemento muscular liso observável no grupo Co 23 em relação aos demais grupos controle

d: Menor porção muscular lisa em RC 23, quando comparado a Co 7, Co 12, Co 18. Não houve discrepância estatisticamente observável em relação ao grupo Co 23

e: Maior conteúdo muscular liso em RC 18 em relação a Co 23 e RC 23

f: Quantidade de colágeno significativamente maior no grupo Co 23 em comparação aos demais grupos controle

g: Menor quantidade de componente colágeno em RC 18 comparado a Co 23 e RC 23.

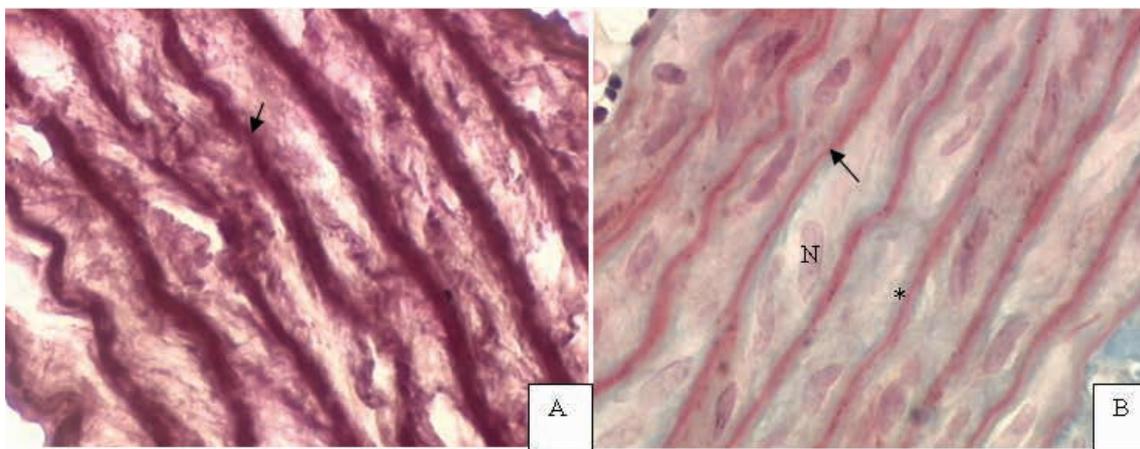


Figura 1. Fotomicrografia da aorta torácica dos animais do grupo controle de 07 meses de idade (controle). A. Orceína – lâminas elásticas íntegras (seta) e dispostas paralelamente a luz do vaso. B. Tricrômico de Masson – Observar núcleos (N) alongados de músculo liso entre as lâminas elásticas (seta) e o colágeno (*). 1280X

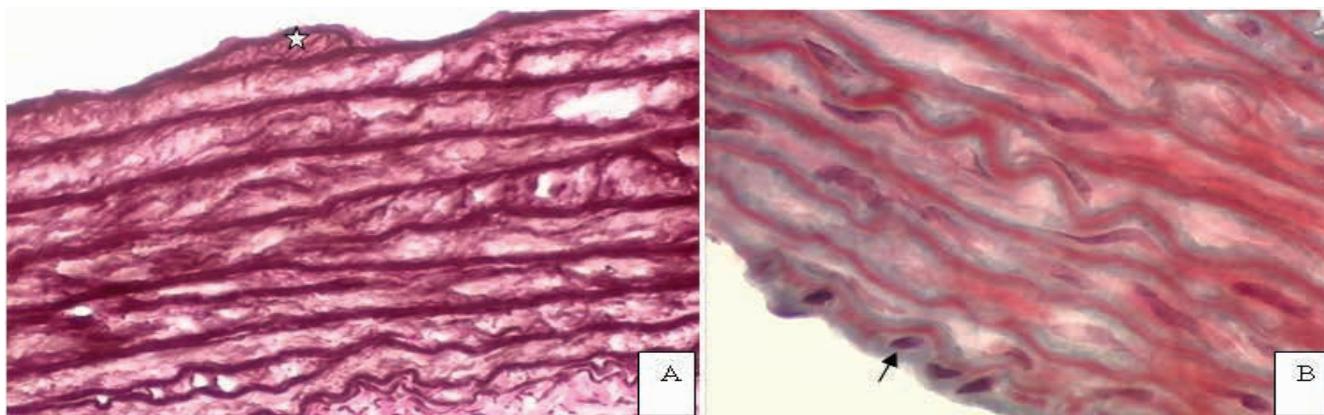


Figura 2. Fotomicrografia da aorta torácica dos animais do grupo controle de 18 meses de idade. A. Orceína – lâminas elásticas apresentando desorganização e área com espessamento da íntima (estrela). B. Tricrômico de Masson – Espessamento da íntima com presença de núcleos de músculo liso (seta) e colágeno. A. 640X. e B. 1280X.

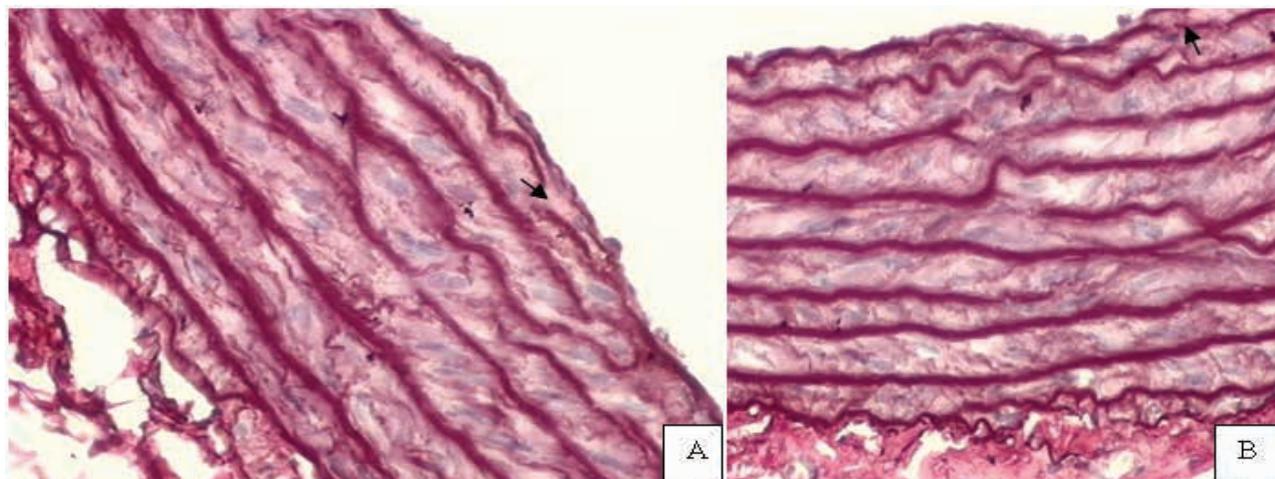


Figura 3. Fotomicrografia da aorta torácica dos animais do grupo com restrição calórica de 18 meses de idade. A e B Orceína – Observar desintegração e duplicação da lâmina elástica interna (seta). 640X..

4 DISCUSSÃO

Esse trabalho pautou-se em realizar um estudo histomorfométrico da íntima-média da aorta torácica de ratos envelhecidos e submetidos à restrição calórica, correlacionando o peso corporal, a média de espessura da parede arterial e sua composição estereológica, computando os elementos elástico, muscular liso e colágeno. Foram descritas alterações comparativas evidenciadas nos grupos de restrição calórica e de *dieta ad libitum* no transcorrer da vida dos animais.

Em grandes artérias humanas, há o espessamento da túnica íntima e o adelgaçamento e ruptura das lâminas elásticas na túnica média (AQUARO et al., 2012). Gupta et al. (2011) obtiveram, em amostras humanas de aorta, uma evolução de hipertrofia da túnica íntima, que começa na infância como praticamente imensurável em microscopia óptica comum, atingindo de metade a dois terços da túnica média em idosos. Modelos animais demonstram equivalência nesse processo e atestam a capacidade da restrição calórica em retardar e atenuar tais alterações (AHMET et al., 2011).

Em nossas observações sob microscopia de luz em todos os grupos, observamos a túnica média da aorta torácica composta por elastina, músculo liso e colágeno, mostrando alternância evidente do componente elástico com o músculo liso. O componente elástico é composto por lamelas de elastina fenestradas e concêntricas que conferem a complacência necessária para seu comportamento fisiológico (ROSS; WOJCIECH, 2012).

Essa armação elástica foi descrita por Wolinski e Glagov (1964) como a unidade fundamental da conduta mecânica da aorta. Alterações da armação elástica foram observadas nos grupos controle de 12, 18 e 23 meses, além de espessamentos da túnica íntima e duplicação da lâmina elástica interna. Essas alterações também foram encontradas nos grupos submetidos à restrição calórica, porém em menor grau. Com o processo de envelhecimento da parede arterial, ocorre um espessamento da íntima-média, com fragmentação dos componentes elásticos, formação de fibrose e aumento do conteúdo colágeno. Fritze et al. (2012) descreveram que a elastogênese mantém-se ao longo da vida, mas as lamelas elásticas sofrem alteração em sua estrutura, com afastamento uma

das outras e a deposição de elementos de matriz, sobretudo o colágeno.

Em relação ao peso corporal, o maior valor obtido foi o do grupo Co 18 ($511,00 \pm 19,79$ g) e o menor do grupo RC 23 ($299,83 \pm 23,25$ g). Os grupos Co 7 ($489,50 \pm 19,51$ g), Co 18 ($511,00 \pm 19,79$ g) e Co 23 ($510,33 \pm 17,15$ g) apresentaram significativamente maior peso corporal em relação a todos os grupos de restrição calórica, corroborando, desde os primeiros estudos de Keys et al. (1950) e de Bloom (1959), a capacidade da restrição calórica de produzir considerável perda ponderal. Entretanto, o grupo Co 12 ($492,92 \pm 9,68$ g) não diferiu significativamente dos grupos de restrição calórica. Quando os grupos de restrição calórica foram comparados entre si, houve diferença significativa entre os grupos RC 12 ($358,50 \pm 11,29$ g) e RC 23 ($299,83 \pm 23,25$ g), demonstrando uma redução ponderal no transcorrer de 11 meses do experimento entre essas duas faixas etárias.

Os resultados relativos a média de espessura íntima-média apontaram a maior medida pertencente ao grupo Co 23 ($132,64 \pm 13,67$ μm), sendo esta significativamente maior em relação ao grupo RC 12 ($103,26 \pm 12,43$ μm ,) e, mais importante, ao RC 23 ($111,49 \pm 4,97$ μm), demonstrando uma possível atuação da restrição calórica contrária ao espessamento arterial, compensando os efeitos do envelhecimento, os quais sabidamente incorrem em uma hipertrofia íntima-média (CRAWFORD, 1961). Complementando, Steppan et al. (2011) descrevem que a espessura da íntima-média em humanos triplica entre os 20 e os 90 anos de idade. Para Collins et al. (2014) o aumento da espessura aórtica ocorre com predomínio do incremento intimal, enquanto a túnica média permanece praticamente constante com a idade.

Em relação à constituição da parede arterial, a descrição estereológica dos componentes elástico, muscular liso e colágeno ainda não é conclusiva. Harkness, Harkness e McDonald (1967) descreveram a quantidade de músculo em 20% liso e a de colágeno e elastina em 60%. Em nosso estudo, os valores apresentaram-se distintos desses achados.

Quando realizada a estatística da análise estereológica do componente elástico (densidade de volume – Vv) entre os grupos controle, houve significativamente menor volume no grupo Co 23 ($27,33 \pm 3,81$) em relação

aos grupos Co 7 ($40,5 \pm 6,10$) e Co 18 ($36,67 \pm 2,13$). Portanto, houve redução do componente elástico global. Robert, Hornebeck e Moczar (1978) alegaram que a desintegração do tecido elástico com aumento da idade é resultado da queda da taxa de síntese e aumento da degradação, presumivelmente parte devido a uma maior atuação da elastase. Apter e Rabinowitz (1966) descreveram que as lâminas elásticas da túnica média degeneram-se e tornam-se adelgaçadas e fragmentadas, sendo substituídas por colágeno, o qual apresenta menor complacência.

O enrijecimento arterial aumenta quando as propriedades elásticas da parede arterial estão reduzidas, procedendo em diminuição da complacência e da capacidade arterial em distender e acomodar variações na pressão arterial (KOTSIS et al., 2011). Sofrendo remodelamento para um estado rígido, a aorta exibe uma menor capacidade em converter parte do débito cardíaco em energia potencial elástica, provocando um aumento substancial na pressão sistólica, acarretando sobrecarga na atuação ventricular esquerda, além de uma redução da pressão diastólica e prejuízo da perfusão coronariana (HAE-YOUNG; BYUNG-HEE, 2010). Foram descritas, além disso, sugestões de que um aumento de pulso pressórico é acompanhado por um progressivo dano da parede vascular e aterogênese, a qual está associada com um aumento nas taxas de morbidade e mortalidade cardiovascular (MADHAVAN et al., 1994; COLLINS 2014). Verifica-se, portanto, que independentemente de outros fatores de risco, como hipertensão, diabetes ou hipercolesterolemia, o envelhecimento constitui, pelas modificações antes enunciadas, um determinante isolado para doenças cardiovasculares (BARODKA; JOSHI; BERKOWITZ, 2011).

Quando confrontados os grupos controle e de restrição calórica, verificou-se quantidade significativamente menor de componente elástico no grupo Co 23 ($27,33 \pm 3,81$) em comparação aos grupos RC 12 ($38,17 \pm 2,34$) e RC 18 ($35,83 \pm 6,36$), porém não houve discrepância estatisticamente observável com relação ao grupo RC 23 ($27,75 \pm 3,34$). Isso possivelmente demonstra que o efeito da senescência na degeneração do componente elástico foi superior a uma possível ação da restrição calórica em preservá-lo além de 18 meses.

Em relação à densidade de volume (Vv) do músculo liso, as análises entre os grupos controle distinguiram significativamente menor quantidade desse componente no grupo Co 23 ($27,67 \pm 6,10$) em comparação aos demais. Isso incorre em oposição aos resultados encontrados em outros trabalhos, que indicam que a quantidade de células musculares lisas sofre hiperplasia e hipertrofia com o envelhecimento (STEMERMAN; WEINSTEIN; ROWE, 1982; HARIRI; ALONSO; HAJJAR 1986; LAKATTA, 2003). Entretanto, encontra respaldo no trabalho em humanos de Bogliolo (1981), que descreveu que, com o avançar da idade, ocorre decréscimo progressivo das células musculares lisas na túnica média. Esse fato é corroborado por Gupta et al. (2011), que comprovaram a partir da 60ª década de vida, as células musculares lisas sofrem atrofia e redução proliferativa, porém não interrompem a produção de matriz colágena, o que explicaria a diminuição do elemento muscular liso e o acréscimo de colágeno com o transcorrer da idade.

Desde os reconhecidos trabalhos de McCaffrey et al. (1988), Schwartz, Campbell e Campbell (1986) há a observação de uma desregulação replicativa das células musculares lisas que integram a parede arterial, acarretando um aumento substancial do componente muscular liso global. Em resposta a lesões endoteliais, as células musculares lisas migram da túnica média para a íntima, acarretando o espessamento intimal (COLLINS et al., 2014). Esse remodelamento arterial, conjuntamente com a deposição lipídica, mediação inflamatória e alteração de componentes fibrosos, condicionaria o surgimento do processo de aterogênese (RAO; KIRANMAYI, 2012).

A comparação entre os grupos controle e de restrição calórica demonstrou diferença significativa entre o grupo RC 23 ($27,75 \pm 3,34$) e os grupos Co 7 ($40,67 \pm 3,54$), Co 12 ($43,17 \pm 2,54$), Co 18 ($41,67 \pm 5,22$), mas não em relação ao grupo Co 23 ($27,67 \pm 6,10$). Com esses dados, infere-se redução da fração muscular lisa arterial em ambos os grupos de 23 meses em relação aos grupos mais jovens. Os grupos de 23 meses, controle e restrição, não diferiram significativamente. Isso sugere a hipótese de que a replicação de células musculares lisas apresenta um limite etário, que em nosso estudo é 18 meses, para sua maior atividade e, a partir de então, esse componente representa uma menor porção volumétrica

da parede arterial, independente do animal ser do grupo experimental ou controle.

A análise da densidade de volume (Vv) do componente colágeno mostrou um aumento significativo no grupo Co 23 ($43,67 \pm 3,59$) comparado aos demais grupos, corroborando estudos que atestam o aumento da quantidade de colágeno com o avançar da idade, sendo esse processo elemento da patofisiologia da rigidez arterial no envelhecimento (AVOLIO et al., 1983). Em uma comparação de todos os grupos, houve disparidade entre o grupo RC 18 ($27,83 \pm 9,04$) e os grupos de 23 meses, ou seja, Co 23 ($43,67 \pm 3,59$) e RC 23 ($42,00 \pm 2,45$), evidenciando a capacidade da restrição calórica em reverter o incremento percentual de colágeno com o envelhecimento, e este não ultrapassou a idade de 18 meses, pois ambos os grupos de 23 não diferiram significativamente.

Evidencia-se, portanto, um limite etário para os possíveis efeitos atenuadores da restrição calórica sobre as alterações da senescência na aorta torácica de ratos.

5 CONCLUSÃO

A restrição calórica foi capaz de reduzir os efeitos do envelhecimento sobre os componentes fibromusculares da aorta torácica, porém com limite etário, sendo este de 18 meses.

REFERÊNCIAS

- AHMET, I.; TAE, H. J.; CABO, R.; LAKATTA, E. G.; TALAN, M. I. Effects of calorie restriction on cardioprotection and cardiovascular health. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 51, p. 263–271, 2011.
- APTER, J. T.; RABINOWITZ, M. Correlation of visco-elastic properties of large arteries with microscopic structure. (1) Methods used and their justification. (2) Elastin and muscle determined chemically. **Circ Res**, v. 19, p. 104–121, 1966.
- AQUARO, G. D.; CAGNOLO, A.; TIWARI, K.; TODIERE, G.; BEVILACQUA, S.; BELLA, G. D.; AIT-ALI, L.; FESTA, P.; GLAUBER, M.; LOMBARDI, M. Age-dependent changes in elastic properties of thoracic aorta evaluated by magnetic resonance in normal subjects. **Inter Cardiovasc Thor Surg**, v.17, p. 1–6, 2013.
- AVOLIO, A. P.; CHEN, S. G.; WANG, R. P.; ZHANG, C. L.; LI, M. F.; O'ROURKE, M. F. Effects of aging on changing arterial compliance and left ventricular load in a northern Chinese urban community. **Circulation**, v.68, n.1 p. 50–58, 1983.
- BADDELEY, A. J.; GUNDERSEN, H. J. G.; CRUZ-ORIVE, L. M. Estimation of surface area from vertical sections. **J. Microscopy**, v. 142, p. 259-276, jun. 1986.
- BARODKA, V.; JOSHI, B. L.; BERKOWITZ, D. E. Implications of vascular aging. **Anesth Analg**, v.112, p. 1048-1060, 2011.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart, 1976. p. 121.
- BLOOM, W. L. Fasting as an introduction to the treatment of obesity. **Metabolism**, v. 8, p. 214-220, 1959.
- BOGLIOLO, L. **Patologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1981.
- COLLINS, J. A.; MUNOZ, J. V.; PATEL, T. R.; LOUKAS, M.; TUBBS, R. S.; The anatomy of aging aorta. **Clin Anat.**, v. 27, n.3, p. 463-466, 2014.
- CRAWFORD, T. Morphological aspects in the pathogenesis of atherosclerosis. **J. Atheroscler Res.**; v. 1, p. 3-25, 1961.
- DANTAS, A. P.; JIMÉNEZ-ALTAYÓ, F.; VILA, E. Vascular Aging: Facts and Factors. **Frontiers in Physiology** v.3, p. 325, 2012.
- EL ASSAR, M.; ANGULO, J.; VALLEJO, S.; PEIRÓ, C.; SÁNCHEZ-FERRER, C. F.; Rodríguez-Mañas, L.; Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. **Front. Physiol.** v.3, p.132, 2012.
- FRITZE, O.; ROMERO, B.; SCHLEICHER, M.; JACOB, M. P.; OH D-Y, STARCHER B.; SCHENKE-LAYLAND, K.; BUJAN,

- J.; STOCK, U. A. Age-related changes in the elastic tissue of the human aorta. **J Vasc Res.**, v. 49, p. 77–86, 2012.
- GENARO, P. S.; SARKIS, K. S.; MARTINI, L. A. O efeito da restrição calórica na longevidade. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 53, n. 5, p. 667-672, 2009.
- GUNDERSEN, H. J. G. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**, v. 96, p. 379-394, 1988.
- GUPTA, S. D.; GUPTA, S. K.; PAL, D. K.; SARAWAGI, R.; GUPTA, P. Microscopic study of aorta in relation of different age groups: an observational study. **Int J Biol Med Res**, v. 2 n.1, p. 398-403, 2011.
- HAE-YOUNG, L.; BYUNG-HEE, O. Aging and Arterial Stiffness. **Circ J**, v.74, n.11, p. 2257–2262, 2010.
- HARIRI, R. J.; ALONSO, D. R.; HAJJAR, D. P. Aging and arteriosclerosis: development of myointimal hyperplasia after endothelial injury. **J Exp Med**. v.164, p. 1171–1178, 1986.
- HARKNESS, M. L. R.; HARKNESS, R. D.; McDONALD, D. A. Collagen and elastin content of the arterial wall in the dog. **Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B**, v. 146, p. 541, 1967.
- HEILBRONN, L. K.; RAVUSSIN, E. Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. **Am J Clin Nutr.**, v.78 n.3, p. 361-369, 2003.
- KEYS, A.; BROZEK, J.; HENSHEL, A.; MICKELSON, O.; TAYLOR, H. L. The biology of human starvation, **University of Minnesota Press**, Minneapolis, 1950.
- KOTSIS, V.; STABOULI, S.; KARAFILLIS, I.; NILSSON, P. Early vascular aging and the role of central blood pressure. **J Hypertens.**, v.29, n.10, p. 1847-1853, 2011.
- KOUBOVA, J.; GUARENTE, L. How does calorie restriction work? **Gen Dev**. v.17 n.3, p. 313-21, 2003.
- LAKATTA, E. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises. Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. **Circulation**, v.107, p. 490-497, 2003.
- LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SER-RANO, M.; KROEMER, G. The hallmarks of aging. **Cell**, v.153, n. 6, p. 1194-1217, 2013.
- MADHAVAN, S.; OOI, W. L.; COHEN, H.; ALDERMAN, M. H. Relation of pulse pressure and blood pressure reduction to the incidence of myocardial infarction. **Hypertension** v.23, p. 395–401, 1994.
- MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **Métodos quantitativos em morfologia**. Rio de Janeiro: EDURJ, 1995.
- MCCAFFREY, T. A.; NICHOLSON, A. C.; SZABO, P. E.; WEKSLER, M. E.; WEKSLER, B. B.; Aging and arteriosclerosis. The increased proliferation of arterial smooth muscle cells isolated from old rats is associated with increased platelet-derived growth factor-like activity. **J Exp Med.**, v.167, n.1, p. 163-174, 1988.
- MCCAY, C. C. M.; CROWELL, M. M. F.; MAYNARD, L. L. A. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. **J Nutr**. v.10, p.63–79, 1935.
- RAO, S. P. V. L. N.; KIRANMAYI, V. S. Biochemical mechanisms underlying atherogenesis. **J Clin Sci Res.**, v.1, p. 24-34, 2012.
- ROBERT, L.; HORNEBECK, W.; MOCZAR, M. Biosynthesis and degradation of elastin as a function of age and arteriosclerosis. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF GERONTOLOGY, Tokyo, 11th, 1978. **Proceedings...**Tokyo, 1978. p. 127.
- ROTH, G. S.; INGRAM, D. K.; LANE, M. A. Caloric restriction in primates and relevance to humans. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 928, p. 305-315, 2001.
- ROSS, M. H.; WOJCIECH, P. **Histologia: texto e atlas**. 6. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2012. p. 425-430.
- SCHWARTZ, S. M.; CAMPBELL, G. R.; CAMPBELL, J. H. Replication of Smooth Muscle Cells in Vascular Disease. **Circulation Research**, v. 58, n.4, 1986.
- SOHAL, R. S.; KU, H. H.; AGARWAL, S.; FORSTER, M. J.; Lal, H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant gener-

ation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. **Mech Ageing Dev.**, v.74, p. 121–133, 1994.

STEMERMAN, M. B.; WEINSTEIN, R.; ROWE, J. W. Vascular smooth muscle cell growth kinetics in vivo in aged rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.79, p. 3863–3866, 1982.

STEPPAN, J.; BARODKA, V.; BERKOWITZ, D. E.; NYHAN, D. Vascular stiffness and increased pulse pressure in the aging cardiovascular system. **Cardiology Research and Practice**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

WEINDRUCH, R.; SOHAL, R. S. Caloric intake and aging. **N Engl J Med.** v. 337, n. 14, p.986-994, 1997.

WEINDRUCH, R.; WALFORD, R. L. Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence, **Science** v.15, n. 4538, p.1415-1418, 1982.

WOLINSKI, H.; GLAGOV, S. Structural basis for the static mechanical properties of the aortic media. **Circ. Res**, n. 14, p. 400-413, 1964.

Recebido em: 25 de maio de 2017

Aceito em: 14 de julho de 2017