

## EFEITO DA RESTRIÇÃO CALÓRICA SOBRE A ATIVIDADE DA PARAOXONASE-1 E CONCENTRAÇÃO DE HDL EM RATOS *WISTAR* ADULTOS

FERNANDA ZARNOTT<sup>1</sup>; CRISTIANE PEREIRA<sup>2</sup>; AUGUSTO SCHNEIDER<sup>3</sup>  
RENATA TORRES ABIB<sup>3</sup>, ELIZABETE HELBIG<sup>3</sup>, SANDRA VALLE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Nutrição – Universidade Federal de Pelotas, UFPel.

<sup>2</sup>Mestranda do PPG Nutrição e Alimentos – Universidade Federal de Pelotas, UFPel.

<sup>3</sup>Docente da Faculdade de Nutrição – Universidade Federal de Pelotas, UFPel.

fernandazarnott@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

A restrição calórica (RC) é definida como uma redução na ingestão calórica de 20 a 40% abaixo do *ad libitum* durante 24 horas, com a garantia do consumo adequado de todos nutrientes necessários para que não ocorra desnutrição (Canto, 2009). A esse modelo de intervenção nutricional têm sido atribuídos importantes efeitos protetores aos sistemas nervoso central e endócrino, assim como, contra o desenvolvimento de diversas doenças crônicas não transmissíveis. Dentre as hipóteses postuladas para os efeitos da RC está a diminuição na taxa metabólica basal, resultando em menor consumo de oxigênio e decréscimo na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Heilbronn, 2003).

Devido a sua instabilidade molecular as ERO geram um alto potencial de reatividade com moléculas biológicas, a exemplo de lipídeos, proteínas ou ácidos nucléicos, paralelamente a ativação de genes pró-inflamatórios (Dröge, 2002).

A exposição excessiva a espécies citotóxicas e a redução da expressão do óxido nítrico (NO) estão diretamente associadas à aterosclerose e a doenças cardiovasculares (Stocker, 2004).

A enzima Paraoxonase-1 (PON-1) é uma esterase cálcio-dependente, sintetizada e secretada no fígado e associada, especificamente, as apolipoproteínas AI e J (apoA-I e apoJ) das partículas de Lipoproteínas de Alta Densidade (HDL) (Mackness, 1991). A enzima se destaca por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Além disso, protege o HDL e reduz a peroxidação lipídica no decorrer da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Ng, 2008).

Moyá et al. (2006a) ao avaliarem o efeito da RC de 40% em relação ao *ad libitum*, mantida por 14 semanas em ratos machos e fêmeas com 60 dias de idade, verificaram que apenas nas fêmeas houve diminuição na atividade da PON-1 a qual foi acompanhada da redução dos níveis de HDL e das apoproteínas A-I e J. Em outro estudo com animais idosos (1 ano de idade) submetidos durante um ano à 40% de RC, Moyá et al. (2006b) verificaram redução do colesterol e triglicerídeos totais, de lipoperoxidação no soro e melhora nos níveis de HDL, contudo, a atividade da PON-1 também diminuiu.

O efeito do consumo calórico e da RC sobre a enzima PON-1 tem sido pouco explorado. Ainda, os escassos estudos realizados indicam efeitos sob diferentes condições experimentais dificultando uma análise comparativa dos resultados. Por seus efeitos sobre a produção de ERO é possível que a RC moderada, até 30% do consumo habitual *ad libitum*, permita uma melhora no funcionamento dos sistemas enzimáticos. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos da RC sobre a atividade enzimática da PON-1 e sua relação com o tempo de tratamento. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da restrição calórica moderada, mantida por oitenta

e cinco dias, sobre a atividade da enzima Paraoxonase-1 e a concentração de HDL de ratos *Wistar* adultos.

## 2. METODOLOGIA

Foram utilizados 15 ratos machos adultos com idade de 65 dias (*Rattus Novergicus*) da linhagem *Wistar/UFPeI*, obtidos do Biotério Central da Universidade. O estudo experimental foi realizado no Laboratório de Ensaio Biológicos da Faculdade de Nutrição da UFPeI. Os animais foram mantidos em gabinetes ventilados em ambiente de temperatura 22-24°C, umidade relativa de 65-75%, e ciclo claro/escuro de 12 horas, em caixas com 4 ratos cada.

O estudo foi realizado durante 90 dias, sendo os 5 primeiros utilizados apenas para a adaptação dos animais ao ambiente e também ao controle do consumo da ração padrão para roedores da marca Nuvilab®. A restrição calórica aconteceu de maneira progressiva. Assim sendo, na primeira semana a restrição calórica foi de 10%, na segunda, 20% e a partir da terceira até o final do experimento, 30%, a fim de evitar um possível estresse nos animais.

Os 15 animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos experimentais, sendo eles: 1) Grupo dieta controle (C70), constituído por 7 animais que receberam ração e água *ad libitum* e 2) Grupo dieta restrição calórica (RC70), constituído por 8 animais, que foram expostos a restrição calórica progressiva de 10 a 30% e água oferecida *ad libitum*.

O consumo de ração foi acompanhado diariamente e semanalmente os animais eram pesados, esse monitoramento foi realizado até o final do experimento. A determinação do índice de Lee foi realizada ao final do experimento, por meio do comprimento naso-anal (cm) e peso (g), através de fórmula específica (Novelli, 2007).

Os animais foram submetidos a jejum de 12 horas antes da eutanásia, a qual ocorreu por decapitação conforme a Resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) nº 714 de junho de 2002, seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2004).

Os tecidos adiposo epididimal, perilombar e perirenal e o tecido hepático foram imediatamente retirados e pesados em balança digital. O sangue foi coletado para as dosagens séricas com kits comerciais. Foram dosados a albumina (Bioclin®), os Triglicérides, o Colesterol Total e o HDL indireto (Labtest Diagnóstica®). O LDL foi obtido segundo a fórmula de Friedwald, calculado através dos valores de Colesterol Total, HDL-c e triglicérides.

A atividade arilesterase da PON-1 foi medida a partir da velocidade de formação de fenol através do aumento da absorbância a 270 nm, a temperatura de 25 °C.

Os resultados foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Para os dados com distribuição normal a comparação entre os grupos foi realizada por meio do Teste *t de Student* e para os não paramétricos foi aplicado o teste de *U Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa um valor de  $p < 0,05$ . Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *BioEstat 5.3* (Soft livre, Instituto Mamirauá).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No quadro 1, são mostradas as características de consumo de ração, peso corporal, composição de massa adiposa, concentração de albumina e de lipídios séricos e atividade arilesterase da enzima Paraoxonase-1.

**Quadro 1.** Características de consumo alimentar, peso corporal total, massa adiposa e hepática e dosagens bioquímicas de ratos *Wistar*, submetidos à alimentação *ad libitum* (Controle) e à restrição calórica (RC).

	Controle N=7 Média ± DP	Restrição Calórica N=8 Média ± DP
<b>Consumo de ração, Peso corporal e Índice de Lee</b>		
Consumo de ração (g)	26,95 ± 0,83	18,86 ± 0,58
Peso corporal final (g)	486,71 ± 35,29	404,12 ± 18,60*
Índice de Lee	0,34 ± 0,00	0,34 ± 0,01
<b>Peso dos tecidos adiposos e hepático</b>		
Tecido adiposo perilombar e renal(g)	7,30 ± 1,36	4,23 ± 1,40*
Tecido adiposo epididimal (g)	7,27 ± 1,74	4,39 ± 1,16*
Tecido hepático (g)	14,55 ± 2,13	10,60 ± 1,07*
<b>Dosagens de albumina e perfil lipídico</b>		
Albumina (mg/dL)	3,59 ± 0,62	3,40 ± 0,49
Colesterol Total (mg/dL)	75,70 ± 16,13	76,80 ± 17,32
Triglicerídeos (mg/dL)	71,26 ± 21,98	34,70 ± 12,60*
VLDL (mg/dL)	16,25 ± 4,39	5,75 ± 2,58*
LDL- Col (mg/dL)	19,11 ± 14,21	32,66 ± 17,31*
HDL- Col (mg/dL)	39,02 ± 6,01	35,35 ± 5,24
<b>Atividade Arilesterase da PON1</b>		
Paraoxonase-1 (kU/L)	113,00 ± 14,91	104,11 ± 13,90

\* p<0,05.

Observa-se que a RC preveniu o ganho de peso e o acúmulo de tecido adiposo, quando comparada ao grupo controle. Sendo este resultado previsível, frente à redução de 30% do teor de energia ao grupo RC. Contudo, o Índice de Lee foi similar entre os grupos.

Os níveis de albumina semelhantes entre os grupos mostram que a restrição calórica moderada, de 30% em relação ao *ad libitum*, preservou o estado nutricional e indicam ingestão proteica adequada pelos animais RC.

As concentrações de TG e VLDL foram reduzidas nos animais RC, o que pode estar relacionado ao menor fluxo de substratos para a síntese endógena de lipídios. Já o aumento do LDL no grupo RC pode ter ocorrido em função da menor taxa metabólica, com conseqüente redução na taxa de oxidação lipídica permitindo um maior tempo de permanência das partículas de LDL na corrente sanguínea. Esse resultado merece maior investigação, uma vez que avaliado em contexto aos demais resultados pode não implicar em aumento de risco para dano arterial.

A manutenção da atividade arilesterase da PON-1 e dos níveis de HDL entre os grupos são resultados importantes, pois indicam que o modelo de intervenção

nutricional avaliado, quando administrado em animais adultos, foi capaz de preservar o efeito antioxidante e anti-inflamatório da enzima.

#### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que a restrição calórica de 30% quando iniciada na idade adulta em ratos *Wistar* machos, não altera a atividade arilesterase da paraoxanase-1, bem como os níveis de lipoproteína de alta densidade. Ainda, previne a síntese endógena de lipídios e o acúmulo de gordura corporal, sem prejuízo da massa corporal total e do estado nutricional.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CANTO, C; AUWERX, J. Caloric restriction, SIRT1 and longevity. **Trends Endocrinol Metabolism**, v. 20, issue 7, p. 325-331, 2009.
- COBEA. **Princípios éticos na experimentação animal**. Acessado em 8 set. 2012. Online. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/>
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.
- HEILBRONN, LK; 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. 361-9, 2003.
- MACKNESS, MI; ARROL, S; DURRINGTON, PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. **FEBS Lett**, v. 286, n. 1-2, p. 152-4, 1991.
- MOYÁ, ET; GIANOTTI, M; PROENZA, AM; LLADÓ, I. The age-related paraoxonase 1 response is altered by long-term caloric restriction in male and female rats. **J Lipid Res**, v. 47, n. 9, p. 2042-8, 2006a.
- MOYÁ, ET; GIANOTTI, M; LLADÓ, I; PROENZA, AM. Effects of caloric restriction and gender on rat serum paraoxonase 1 activity. **J Nutr Biochem**, v. 17, n. 3, p. 197-2013, 2006b.
- NG, DS; CHU, T; ESPOSITO, B; HUI, P; CONNELLY, PW; GROSS, PL. Paraoxonase-1 deficiency in mice predisposes to vascular inflammation, oxidative stress, and thrombogenicity in the absence of hyperlipidemia. **Cardiovasc Pathol**, v. 17, n. 4, p. 226-32, 2008.
- NOVELLI, ELB; DINIZ, YS; GALHARDI, CM; EBAID, GMX; RODRIGUES, HG; MANI, F; FERNANDES, AAH; CICOGNA, AC; NOVELLI FILHO, JLVB. Parâmetros antropométricos e marcadores de obesidade em ratos. **Animals Ltd. Laboratory Animals**, v. 41, p. 111-119, 2007.
- STOCKER, R; KEANEY, JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol**, v. 84, n. 4, p. 1381-478, 2004.