

EFEITO DA RESTRIÇÃO CALÓRICA MODERADA SOBRE O PERFIL LIPÍDICO E A ATIVIDADE DA PON1 EM RATAS *WISTAR* OVARIETOMIZADAS

CAROLINE RODRIGUES BITENCOURT¹; SANDRA COSTA VALLE²; PAULO CAVALHEIRO SCHENKEL³

¹Universidade Federal de Pelotas – carol.r.bitencourt@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – sandracostavalle@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – schenkel.paulo@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte nos países ocidentais. Somado a isso, o número de internações e os custos com o tratamento dos pacientes que sobrevivem aos eventos agudos são exorbitantes para os cofres públicos. Neste sentido, tem sido estimulada cada vez mais a descoberta de terapias profiláticas que possam evitar/retardar tais complicações e custos. Neste contexto, a restrição calórica (RC), não associada com a desnutrição, tem se mostrado promissora (MARZETTI et.al., 2009; GONZÁLEZ et. al., 2012).

A restrição calórica sem má nutrição é uma intervenção nutricional capaz de estender a longevidade em várias espécies, inclusive mamíferos (TREPANOWSKI et al., 2011; ROTH e POLOTSKI, 2012). Ela também tem sido associada à prevenção de doenças relacionadas à idade, dentre as quais diabetes (HE et al., 2012), câncer (KLEBANOV, 2007) e as doenças cardiovasculares (DCV) (WEISS e FONTANA, 2011).

A RC está associada à redução dos fatores de risco cardiovascular (CV) por diminuir os níveis de triglicerídeos (TG) e aumentar os níveis de lipoproteína de alta densidade HDL (CRUZEN e COLMAN, 2009). Atualmente, a razão de apolipoproteínas aterogênicas/antiaterogênicas e a identificação das diferentes partículas de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e HDL têm sido indicadas como medidas adicionais de risco CV. Além disso, uma importante enzima antiaterogênica e anti-inflamatória associada ao HDL, a paraoxonase 1 (PON1), tem sido investigada quanto a seu papel na redução do risco CV e seu comportamento frente à RC.

Neste contexto, o estrogênio tem merecido destaque uma vez que exerce ação moduladora sobre os lipídios e o sistema redox celular. Estudos tem observado que o estrogênio apresenta ação antioxidante e antiinflamatória por potencializar direta e indiretamente as capacidades antioxidantes (POZZI et. al., 2006; VEGETO et. al., 2003).

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito o perfil lipídico e a atividade da PON1 em ratas *Wistar* ovariectomizadas mantidas em restrição calórica moderada por 8 semanas.

2. METODOLOGIA

2.1 Local de realização

O estudo foi desenvolvido nas dependências do Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas.

2.2 Animais e grupos

Foram utilizadas 20 ratas *Wistar* (60 dias) provenientes do biotério do Campus Capão do Leão da Universidade Federal de Pelotas. Essas foram

divididas em 4 grupos experimentais ($n=5/\text{grupo}$), sendo eles: Controle - Sham (CS): ratas com dieta livre e submetidos à cirurgia fictícia de ovariectomia bilateral; Controle - OVX (CO): ratas com dieta livre e ovariectomizadas; Restrição Calórica – Sham (RS): ratas com restrição calórica e submetidos à cirurgia fictícia de ovariectomia bilateral; Restrição Calórica – OVX (RO): ratas com restrição calórica e ovariectomizadas.

Os animais foram mantidos em caixas (5 animais/caixa) no alojamento do biotério sob períodos de 12 horas luz, 12 horas escuro, com temperatura e umidade relativa de 22-24°C e 65-75%, respectivamente.

2.3 Dieta e restrição calórica

A dieta utilizada foi ração padrão para roedores marca Nuvilab. Os animais passaram por uma semana de adaptação ao ambiente e ao controle do consumo da dieta. Em seguida, enquanto os animais controle receberam dieta livre, foi iniciada a restrição calórica progressiva: 10% na primeira semana, 20% na segunda e 30% até a décima primeira semana. Portanto, totalizando 8 semanas em restrição calórica de 30% (GONZÁLES et. al., 2012). A média de consumo alimentar dos grupos foi calculada semanalmente (toda segunda-feira). O percentual da restrição foi calculado a partir da média de consumo alimentar dos animais na primeira semana de adaptação.

2.4 Determinação e Monitoramento do Ganho de Peso

Todos os animais foram pesados, em balança eletrônica, semanalmente, para determinação do ganho e/ou perda de peso, afim de monitorar a evolução do peso corporal.

2.5 Ovariectomia (OVX)

Após 4 semanas de restrição calórica 30% as ratas foram submetidas ao procedimento cirúrgico. Foram anestesiadas (quetamina 90mg/kg⁻¹, xilazina 10 mg/kg⁻¹ i.p.) e a ovariectomia ou cirurgia fictícia foi realizada bilateralmente.

2.6 Obtenção do soro, dosagens bioquímicas e análise enzimática

O sangue foi coletado no momento da decapitação e centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos. O soro obtido foi armazenado a -80°C até o momento das análises. As dosagens bioquímicas foram realizadas com kits enzimáticos comerciais e quantificadas em espectrofotômetro. Foi dosado: colesterol total (CT), TG, HDL e a albumina. O teor de LDL foi determinado pela equação de Friedewald. A atividade arilesterase da PON1 foi medida no soro, a partir da velocidade de formação de fenol por meio do aumento da absorbância a 270 nm, a temperatura de 25°C, conforme descrito por Browne et al. (2007).

2.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (\pm DP). A análise ANOVA de duas vias foi realizada para testar o efeito do tratamento, da dieta e suas interações. Quando a interação foi significativa o teste t foi realizado para comparação entre grupos. O nível de significância adotado foi de 5%. Para as análises foi utilizado o Software GraphPad Prism 5.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peso final das ratas nota-se que a RC foi capaz de reduzir o peso corporal. Ao analisar o grupo OVX observa-se o efeito da RC pois ocorreu uma redução ($p<0,05$) de 16,5% do peso corporal nas ratas submetidas à RC em comparação com o controle. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos com ratos submetidos ao mesmo percentual de RC (RIBEIRO et. al., 2009; RIBEIRO et. al., 2012).

O perfil lipídico das ratas pode ser observado na Tabela 1. Ao analisar os efeitos da RC sobre os lipídios séricos constatou-se que ela foi capaz de reduzir ($p<0,05$) em 22,8% a concentração sérica de TG, mas não teve efeito significativo em CT, HDL e LDL. Porém ao analisarmos o efeito do tratamento cirúrgico observa-se que houve um efeito significativo nos níveis séricos de CT e HDL, as concentrações séricas foram maiores ($p<0,05$) no grupo OVX. Estudos com animais e humanos submetidos à RC apresentam níveis significativamente mais baixos de TG e aumento no HDL (CRUZEN e COLMAN, 2009). O estrogênio tem merecido destaque uma vez que exerce ação moduladora sobre os lipídios apresentando ação antioxidante e antiinflamatória, pois é capaz de diminuir os níveis de CT e LDL e aumentar os níveis de HDL. De fato, seu potencial terapêutico antiinflamatório tem sido mostrado em ratas (POZZI et. al., 2006; VEGETO et. al., 2003). No entanto sua escassez está relacionada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares, pois afeta os lipídeos séricos (MURPHY, 2011). Porém, no presente estudo observou-se que as ratas ovariectomizadas tiveram um aumento significativo dos níveis de HDL, possivelmente pelo curto período analisado, neste sentido são necessárias mais pesquisas descobrir os possíveis mecanismos envolvidos neste resultado.

Quanto à atividade arilesterase da PON1, evidenciou-se que a RC manteve a atividade da enzima, independente dos níveis de estrogênio. Entretanto, a razão PON1/HDL foi menor ($p<0,05$) no grupo OVX comparado grupo Sham, independente do tipo de dieta. Estudos têm demonstrado que a PON1 parece sensível à RC, sendo a intervenção associada com uma diminuição na atividade da enzima (MOYA et. al., 2006; SKRHA, 2009). Nosso estudo mostra que a atividade da PON1 foi similar entre os grupos e que a RC, independentemente dos níveis de estrogênio, promoveu a manutenção da atividade enzimática.

A concentração de albumina sérica mostrou-se dentro dos limites adequados a roedores e foi similar entre todos os grupos, mostrando assim que a RC não alterou o estado nutricional. Estudos com animais na fase adulta submetidos à RC de 30% também não encontraram alterações nos valores de albumina (RIBEIRO et. al., 2009; RIBEIRO et. al., 2012).

Tabela 1. Análises bioquímicas, atividade da PON1 e caracterização de peso em ratas *Wistar*. (n=20)

| | Grupos | | | | Valor <i>p</i> | | |
|--------------------------|------------|------------|--------------|-------------|----------------|-------|------------|
| | CS | RS | CO | RO | Interação | Dieta | Tratamento |
| Peso final (g) | 257,0±11,3 | 246,4±12,7 | 284,0±13,7 | 237,2±19,0* | 0,013 | 0,001 | 0,188 |
| Triacilgliceróis (mg/dL) | 127,0±20,4 | 98,0±21,8* | 112,7±12,9 | 103,0±5,6 | 0,207 | 0,018 | <0,001 |
| Colesterol (mg/dL) | 99,3±19,6 | 114,0±20,0 | 114,0±17,4** | 124,3±12,4 | 0,148 | 0,744 | 0,012 |
| HDL (mg/dL) | 44,7±5,5 | 56,0±14,0 | 85,0±14,0** | 85,5±13,6** | 0,365 | 0,286 | <0,001 |
| LDL (mg/dL) | 28,5±6,0 | 42,3±24,8 | 35,0±9,9 | 28,0±11,3 | 0,131 | 0,628 | 0,551 |
| PON1 (KU/L) | 128,3±31,6 | 136,0±32,0 | 144,0±29,1 | 130,0±22,1 | 0,41 | 0,807 | 0,723 |
| PON1/HDL | 3,0±1,1 | 2,5±0,5 | 1,7±0,4** | 1,6±0,4** | 0,582 | 0,28 | 0,002 |
| Albumina (mg/dL) | 2,1±0,4 | 2,2±0,4 | 2,3±0,4 | 2,1±0,3 | 0,446 | 0,744 | 0,565 |

Os valores são expressos em média ± desvio padrão. Nível de significância de 5% teste t. * Indica diferença significativa comparada ao grupo controle ($p<0,05$). ** Indica diferença significativa comparada ao grupo sham ($p<0,05$).

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que a RC moderada manteve tanto o estado nutricional proteico adequado quanto à atividade da PON1 independente do tratamento. Além disso, a ovariectomia é capaz de modificar o perfil lipídico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Browne, RW, Koury, ST, Marion, S, Wilding, G, Muti, P, Trevisan, M. Accuracy and Biological Variation of Human Serum Paraoxonase 1 Activity and Polymorphism (Q192R) by Kinetic Enzyme Assay. **Clin Chem**, 2007; 53(2):310–317
- Cruzen C; Colman R. Effects of Caloric Restriction on Cardiovascular Aging in Non-human Primates and Humans. **Clin Geriatr Med.**, 2009; 25:733–43.
- González O, Tobia C, Ebersole J, Novak M.J. Caloric restriction and chronic inflammatory diseases. **Oral Dis**, 2012; 18:16-31.
- He, X.Y., Zhao, X.L., Gu, Q., Shen, J.P., Hu, Y., Hu, R.M. Caloric restriction from a young age preserves the functions of pancreatic β cells in aging rats. **Tohoku J. Exp. Med.**, 2012; 227 (n.4), 245-252.
- Klebanov, S. Can short-term dietary restriction and fasting have a long-term anticarcinogenic effect? **Interdisciplinary Topics in Gerontology**, 2007; v. 35, p.176-92.
- Marzetti, E; Wohlgemuth, S.E.; Anton S.D., et al. Cellular mechanisms of cardioprotection by calorie restriction: state of the science and future perspectives. **Clin Geriatr Med** 2009; 25:715-32.
- Moya ET, Gianotti M, Llado I, Proenza, AM. **Effects of caloric restriction and gender on rat serum paraoxonase 1 activity.** **J Nutr Biochem.** 2006a; 17:197–203.
- Murphy E, Lagranha C, Deschamps A, et al. Mechanism of cardioprotection: what can we learn from females? **Pediatr Cardiol** 2011;32:354-359.
- Pozzi S, Benedusi V, Maggi A, Vegeto E. Estrogen action in neuroprotection and brain inflammation. **Ann N Y Acad Sci**, 2006; 1089:302-23.
- Ribeiro LC, Quincozes-Santos A; Leite MC, Abib RT, Kleinkauf-Rocha J, Biasibetti R, Rotta LN, Wofchuk ST, Perry MLS, Gonçalves CA, Gottfried C. Caloric restriction increases hippocampal glutamate uptake and glutamine synthetase activity in Wistar rats. **Neuroscience Res.** 2009;64:330–34
- Ribeiro LC, Rodrigues L, Quincozes-Santos A, Tramontina AC, Bambini-Junior V, Zanutto C, Diehl LA, Biasibetti R, Kleinkauf-Rocha J, Dalmaz C, Gonçalves CA, Gottfried C. Caloric restriction improves basal redox parameters in hippocampus and cerebral cortex of *Wistar* rats. **Brain Res.** 2012;1472(7):11-19.
- Roth, L.W.; Polotsky, A.J. Can we live longer by eating less? A review of caloric restriction and longevity. **Maturitas**, 2012; v. 71, p.315-19.
- Skrha J. Effect of caloric restriction on oxidative markers. **Adv Clin Chem.** 2009; 47:224-42
- Trepanowski, J.F.; Canale, R.E.; Marshall, K.E.; Kabir, M.M.; Bloomer, R.J. Impact of caloric and dietary restriction regimens on markers of health and longevity in humans and animals: a summary of available findings. **Nutrition Journal**, 2011; v. 10, p. 107-19.
- Vegeto E, Belcredito S, Etteri S, Ghisletti S, Brusadelli A, Meda C, et al. Estrogen receptor- α mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:9614-9.
- Weiss, E.P.; Fontana, L. Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature. **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, 2011; v. 301, p. H1205–H1219.