

## **EFEITO DA RESTRIÇÃO CALÓRICA SOBRE O NÍVEL DE PARAOXONASE 1 NO SORO EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM HORMÔNIO DO CRESCIMENTO**

**BIANKA MACHADO ZANINI<sup>1</sup>; DRIELE NESKE<sup>2</sup>; TATIANA SACCON<sup>3</sup>; ELIDA RATMANN<sup>4</sup>; LARISSA BORBA<sup>5</sup>; AUGUSTO SCHNEIDER<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [Bianka\\_Zanini@hotmail.com](mailto:Bianka_Zanini@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [drika\\_neske@yahoo.com.br](mailto:drika_neske@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [elidagrattmann@gmail.com](mailto:elidagrattmann@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [larissa\\_bsaraiva@hotmail.com](mailto:larissa_bsaraiva@hotmail.com)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [augustoschneider@gmail.com](mailto:augustoschneider@gmail.com)

### **1. INTRODUÇÃO**

A alimentação é um dos fatores ambientais envolvidos no tratamento que possui um grande impacto no prognóstico de algumas doenças. A restrição de calorias (RC) reflete em mudanças metabólicas que melhoram o perfil glicêmico, resistência à insulina, reduzem os fatores de risco cardiovascular e triglicerídeos (OBATA *et al.*, 2003). Alterações na atividade da paraoxonase 1 (PON1) têm sido relatadas conforme modificações alimentares, levantando a hipótese de uma possível modulação dietética dessa enzima (SKRHA, 2009). A restrição calórica diminui a atividade sérica da PON1 e esta resposta é dependente de gênero (Thomàs-Moyà *et al.*, 2006). As dietas pro-aterogênicas estão relacionadas a uma queda significativa, tanto na atividade como na concentração de PON1. Uma vez que a enzima é altamente suscetível à inativação por oxidação e a RC relaciona-se com um estado oxidativo mais baixo, sendo assim um modelo experimental adequado para estudar a PON1.

As paraoxonases são uma família de proteínas que protegem o LDL E HDL da oxidação (AVIRAM E ROSENBLAT, 2005). Circula no plasma exclusivamente ligada ao HDL, sintetizada principalmente no fígado e denominada uma esterase cálcio dependente. Os padrões reduzidos de atividade da PON1 podem refletir no aumento do estresse oxidativo e, conseqüentemente, aumento do risco de doença cardiovascular (DURRINGTON *et al.*, 2001). Faz parte de uma família gênica composta por três genes PON1, PON2 e PON3 localizada no cromossomo humano 7. O gene da PON1 exibe 9exons e consite de 354 amonoácidos (PRIMO-PARMO *et al.*, 1996). Em contraste, PON2 e PON3 carecem de atividades de paraoxonase ou arilesterase. Após um estudo longitudinal prospectivo revelar que níveis reduzidos é um fator de risco para doenças cardiovasculares cabido à doença pré-existente ou outros fatores de risco, despertou-se interesse pela enzima.

O camundongos Ames Dwarf apresentam mutação recessiva no gene Prop 1, o que leva à não diferenciação de três tipos celulares na adenohipófise. Devido à ausência destas células nos Ames homozigotos, não há produção de hormônio de crescimento (GH), hormônio tireotrófico e prolactina (SORNSEN *et al.*, 1996). Após o nascimento, os animais têm crescimento corporal reduzido. A deficiência em GH leva estes animais a apresentarem níveis baixíssimos de IGF1 no plasma e tempo de vida prolongado (FLURKEY *et al.*, 2001). Através de mecanismos de redução de GH e IGF1, em roedores a RC de curto prazo reduz os níveis de GH, enquanto a longo prazo mantém a liberação pulsante de GH (SONNTAG *et al.*, 1995). Essas descobertas, juntamente com a análise da expressão gênica em Ames Dwarf, GHRKO e RC, indicam que GH e RC influenciam a longevidade por caminhos diferentes, porém sobrepostos.

Nesse contexto, investigações veem sendo feitas frente de que substâncias químicas, dietas e estilo de vida, estados patológicos e fisiológicos, têm demonstrado afetar significativamente a atividade enzimática da PON1 (COSTA, 2003). O presente estudo teve como objetivo investigar a associação da restrição calórica sobre o nível de PON1 no soro de camundongos Ames Dwarf deficiente em GH.

## 2. METODOLOGIA

Para o experimento de longa duração foram utilizados 40 camundongos (n=20 normais N/df e n=20 Ames dwarf df/df) com idade de 30 dias mantidos em condições controladas de temperatura, luz e umidade ( $22 \pm 2$  °C, ciclos de 12 horas claro/12 horas escuro e 40%-60% respectivamente). Durante 6 meses, 10 camundongos de cada grupo foram submetidos a RC. Para o experimento de curta duração, 28 camundongos C57BL6 foram distribuídos em quatro grupos de 7 animais cada: grupo controle, RC de 30% por 7 dias, 14 dias e 28 dias. Todos animais foram alimentados com ração padrão para roedores. Os grupos controle receberam ração ad libitum e para o grupo RC foi calculado uma quantidade 30% menor levando em consideração a média do consumo da semana anterior do grupo controle.

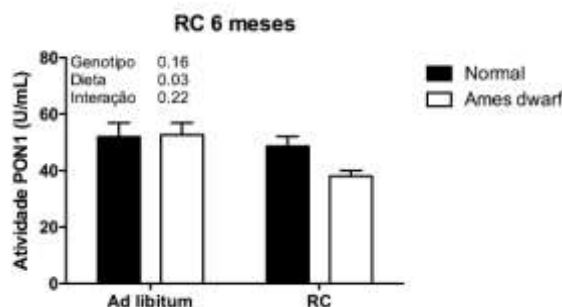
A atividade arilesterase da PON1 foi medida a partir da velocidade de formação de fenol através da monitorização do aumento da absorvância 270 nm a 25°C. O reagente de trabalho consistiu em Tris/HCl 20 mM, pH 8,0, contendo 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  e 4 mM de fenilacetato como substrato. As amostras diluídas 1:3 em tampão foram adicionadas e a mudança na absorvância foi registrada durante 60 seg. Uma unidade de atividade arilesterase foi considerada igual a 1 mM de fenol formado por minuto. A atividade é expressa em kU/L ou U/mL.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism 6.0. O teste estatístico Two Way ANOVA para o experimento de longa duração e One Way ANOVA para o de curta duração. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativamente estatísticos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

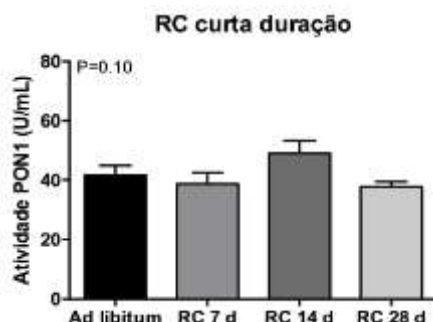
Foram investigados numa primeira instância, os efeitos dos níveis de RC moderada, em camundongos normais e Ames sobre a atividade de PON1. Na Figura 1, após o período de 6 meses em RC, a dieta reduziu a atividade de PON1, apesar de não ter sido afetada nos animais Ames. Portanto, foi observada uma diferença significativa numa análise geral no grupo da RC.

Figura 1. Camundongos (AL e RC) submetidos a RC durante 6 meses



A Figura 2, compara atividade de PON1 no soro de camundongos com dieta ad libitum e curtos períodos de RC. Assim, a PON1 não foi afetada por períodos curtos de RC.

Figura 2, atividade de PON1 no soro de camundongos com dieta AL e curtos períodos de RC



Corroborando com os achados de (BONKOWSKI *et al.*, 2009) foi possível identificar que os animais com deficiência de GH modulam os efeitos de diferentes intensidades de RC. No 14º dia houve um aumento na atividade de PON1, esse dado sugere que o aumento da resistência a vários estressores é um mecanismo importante que liga a sinalização somatotrófica reduzida ao envelhecimento tardio nos camundongos GH deficientes. Vários estudos recentes procuram identificar mecanismos celulares que possam explicar a resistência ao estresse reforçada de camundongos com deficiência de GH (BARTKE, 2011). Os animais Ames, não tiveram alteração na PON1 como observada para RC, essa análise de expressão reforça a hipótese de que ocorre diferentes mecanismos de ação da deficiência de GH e RC, os mecanismos agem de modo independente em etapas de sinalização.

Assim, a diminuição da atividade sérica de PON1 em resposta a RC pode ser indicativa de uma perda de antioxidante, podendo fazer parte de uma estratégia levando a economia de energia em uma situação de diminuição e ingestão de nutrientes, consequentemente menor risco de estresse oxidativo resultando em proteção menos necessária das partículas de LDL. Uma vez que a atividade PON1 mais alta na dieta AL pode ser atribuída a uma maior estabilidade dos complexos HDL/PON1 e diminuíram apenas nos animais RC. A RC poderia estar associada a uma diminuição dos conteúdos de HDL, o que pode ser responsável pela perda da atividade sérica de PON1.

A RC em curtos períodos não afetou a atividade sérica de PON1 nos camundongos. A longo prazo ela reduz a taxa metabólica ajustada para o peso corporal ocasionada pela baixa ingestão de energia proveniente da dieta, e consequentemente, uma diminuição do depósito de tecido adiposo. Alteração do depósito de gordura além de afetar o peso, poderia modificar a secreção de hormônios e por isso levar a alterações na PON. No curto prazo não é identificado essas modificações e por isso não se viu efeito da RC (BARTKE *et al.*, 2001).

#### 4. CONCLUSÕES

Assim, podemos concluir que a restrição calórica reduz a atividade de PON1 no longo prazo em camundongos, o mesmo não sendo observado em períodos curtos de RC ou em camundongos deficientes em GH.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVIRAM, M.; ROSENVLAT, M. Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. **Curr Opin Lipidol**, v.16, p.393 – 399, 2005.

BARTKE, A. Pleiotropic effects of growth hormone signaling in aging. **Trends in endocrinology and metabolism**: TEM, v.22, n.11, p.437-442, 2011.

BARTKE, A.; COSCHIGANO, K.; KOPCHICK, J.; VARADARJ, O.; *et. al.* Genes That Prolong Life: Relationships of Growth Hormone and Growth to Aging and Life Span, **The Journals of Gerontology: Series A**, v. 56, n. 8, p.340–349,2001.

BONKOWSKI, M.S.; DOMINICI, F.P.; ARO, S. *et al.* Rompimento de Growth Hormone Receptor Previne de Restrição de Calorias de melhorar a ação da insulina e da longevidade. **Maedler K, ed. PLoS ONE**, v. 42, n.4, p. 45-67, 2009.

COSTA, L.G.; COLE, T.B.; JARVIK, G.P.; FURLONG, C.E., Functional Genomics of the Paraoxonase (PON 1) Polymorphisms: Effects on Pesticide Sensitivity, Cardiovascular Disease, and Drug Metabolism. **Annu Rev Med**, v. 54, p.371-92,2003.

DURRINGTON,P.N; MACKNESS, B.; MACKNESS, M.I. Paraoxonase and Atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.21, p.473-80, 2001.

FLURKEY, K.; PAPACONSTANTINOU, J.; MILLER, R.A.; HARISON, D.E. Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. **Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A** v.98, p. 6736-6741, 2001.

OBATA, T.; ITO T.; YONEMURA, A.; AYORI, M.; *et. al.* Paraoxonase gene variant is associated with a change in HDL-cholesterol level during dietary caloric restriction in non diabetic healthy males. **J Atheroscler Thromb** v.10,n.1,p. 57-62, 2003.

PRIMO-PARMO, S. L.; SORENSON, R. C.; TEIBER, J.; LA DU, B. N. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. **Genomics**, v.33, n.3, p.498- 507, 1996.

SKRHA, J. Effect of caloric restriction on oxidative markers. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 47, p. 224-42, 2009.

SONNTAG, W.E.; XU X.; INGRAM, R.L.; D'COSTA, A. Moderado restrição calórica altera a distribuição subcelular de ARNm de somatostatina e aumenta o crescimento de amplitude de pulso hormona em animais idosos. **Neuroendocrinologia**, v. 61, p. 601-608, 1995.

SORNSEN, M.W.; Wu, W.; DASEN, J.S.; FLYNN, S.E.; *et. al.* Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. **Nature** v.384, p. 327-333, 1996.

THOMAS-MOYÀ, E.; GIANOTTI, M.; LLADÓ, I.; PROENZA, A.M. Effects of caloric restriction and gender on rat serum paraoxonase 1 activity. **J Nutr Biochem**, v.17, p. 197-203, 2006.