

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
ESCOLA DE ENFERMAGEM**

DIANE SILVEIRA

**ESTUDO DA ATIVIDADE DA PON 1 E PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO EM
RATOS (*Rattus norvegicus*) NEONATOS E ADULTOS,
MACHOS E FÊMEAS**

PORTO ALEGRE

2018

DIANE SILVEIRA

**ESTUDO DA ATIVIDADE DA PON 1 E PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO EM
RATOS (*Rattus norvegicus*) NEONATOS E ADULTOS,
MACHOS E FÊMEAS**

Trabalho de Conclusão de Curso da Escola de Enfermagem e Saúde Coletiva da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de bacharel em Enfermagem.

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Trapp

Co-orientadora: Prof^a Dra. Márcia Koja Breigeiron

PORTO ALEGRE

2018

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer uma pessoa muito especial que tem vivenciado toda esta caminhada desde o primeiro dia da graduação até as últimas semanas de loucura do TCC, que estava lá quando eu duvidei de tudo, até do meu potencial, quando eu tive vontade de jogar tudo para o alto, ele me disse que valeria a pena, e valeu. Obrigada Rafael Perfeito, te amo!

Agradeço a professora Marcia Trapp por topar fazer um TCC com um projeto de enfermeira, sem noção do que estava fazendo, que acompanhou todo o meu crescimento nesse último ano, que ficou até tarde corrigindo referencial, indo nos finais de semana fazer experimento, que acreditou que daria certo.

Agradeço ao pessoal do laboratório por ter me acolhido. A cada um que me ensinou ou me ajudou em alguma parte deste trabalho e que tornou o ambiente do laboratório agradável e divertido.

Agradeço a professora Márcia Kojá Breigeiron pela co-orientação e a professora Sandra Costa Valle pelo e auxílio na técnica de dosagem da atividade de PON 1.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVOS	7
2.1 Objetivo Geral	7
2.2 Objetivos Específicos	7
3 REVISÃO DA LITERATURA	8
3.1 Dislipidemia e Fisiopatologia	8
3.2 Estresse Oxidativo	9
3.3 PON1 - Mecanismo de ação e funções	9
4 MÉTODO	12
4.1 Tipo de Estudo	12
4.2 Local do Estudo	12
4.3 População e Amostra	12
4.4 Variáveis do Estudo	13
4.5 Coleta de Dados	13
4.5.1 Animais neonatos	13
4.5.2 Animais adultos	14
4.5.3 Eutanásia	14
4.6 Procedimentos Experimentais	15
4.6.1 Índices somáticos, coleta e armazenamento dos tecidos	15
4.6.2 Análises bioquímicas	15
4.7 Análise dos Dados	15
4.8 Aspectos Éticos	16
4.9 Proteção ao Pesquisador e Descarte de Resíduos	16
REFERÊNCIAS	17
ARTIGO	23
ANEXO I – Parecer da COMPES-ICBS	52
ANEXO II – Parecer do CEUA	53
ANEXO III – Normas da revista	54

1 INTRODUÇÃO

O perfil lipídico consiste na dosagem de Colesterol Total (CT), da lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein* - LDL), da lipoproteína de alta densidade (*High Density Lipoprotein* - HDL) e dos Triacilgliceróis (TGC), podendo ou não ser incluídas as lipoproteínas de muito baixa densidade (*Very Low Density Lipoprotein*- VLDL) (SBAC, 2016). As dislipidemias estão associadas a diversas doenças, como as doenças cardiovasculares (ALBERTI et al., 2009). Neste sentido, o estudo da associação do perfil lipídico com fisiopatologias em crianças e adultos é de extrema importância para a prevenção de doenças e promoção da saúde. As doenças cardiovasculares são a primeira causa de morte no mundo e, no Brasil, a aterosclerose é a principal responsável pela ocorrência dessas doenças (SANTOS et al., 2011).

Nas placas ateroscleróticas, onde a peroxidação lipídica está aumentada, a enzima Paraoxonase 1 (PON1) atua como um potente antioxidante (STRAKOVSKY et al., 2014). Além disso, essa enzima está associada com diversas doenças como Alzheimer, Doença Renal Crônica, comprometimento hepático, *Diabetes Mellitus* tipo I e II (FRIDMAN et al., 2016), depressão e transtorno bipolar (MOREIRA et al., 2017). Estudos recentes sugerem a associação de dislipidemias com a atividade da PON1 plasmática, sendo que quanto maior o nível de TGC e LDL e menores as taxas de HDL séricos, menor a atividade da PON1, (CHERAGHI et al., 2017; FRIDMAN et al., 2016).

Em seres humanos, o perfil lipídico de crianças e adultos é dinâmico e diferente, sendo distinto, também, entre homens e mulheres (REPÁRAZ et al., 1998). O perfil de lipoproteínas dos neonatos contém muito pouco VLDL e LDL (GUGLIUCCI; MENINI, 2015) quando comparado ao dos adultos (STOZICKÝ; SLABÝ; VOLENIKOVÁ, 1982). Estudos realizados com os neonatos demonstraram que a atividade da PON1 é menor do que em adultos, podendo estar associada com a diminuição das defesas antioxidantes em neonatos prematuros (ALTUNHAN et al., 2013). Contudo, existem poucos trabalhos que investigam a ação da PON1 plasmática e tecidual em diferentes idades e sexo, tanto em humanos como em modelos animais. O desenvolvimento de estudos básicos com modelos animais torna-se importante para fornecer a base de conhecimento sobre esta temática.

A pesquisa básica é o suporte para a prática profissional na área da saúde. A natureza prática da enfermagem remete à busca, muitas vezes, pela transposição da pesquisa básica experimental, abrindo perspectivas para a profissão em múltiplas direções (CÁRNIO, 2011). A fisiologia é uma das bases da Enfermagem e a pesquisa básica experimental subsidia

alicerces para compreender os processos de saúde e doença, bem como a tomada de decisão na prática assistencial.

A motivação para a realização deste estudo vem do entendimento da importância da fisiologia para a prática profissional da Enfermagem. A partir das vivências no cuidado aos pacientes, durante os estágios assistenciais, a autora considera de extrema importância o conhecimento da fisiologia para o melhor entendimento do organismo humano, o que remete a melhores estratégias de cuidado. Além disso, a participação da autora como monitora das disciplinas de Fisiologia Humana I e II (CBS 03045 e CBS 03046) do Curso de Graduação da Escola de Enfermagem/UFRGS, durante o ano de 2017, despertou o interesse pela temática apresentada no presente projeto de pesquisa. A realização deste projeto visa, por meio do desenvolvimento do conhecimento básico da fisiologia, associar este conhecimento com a prática assistencial para melhor compreender e cuidar o paciente com doença crônica não transmissível.

Sendo as doenças crônicas não transmissíveis as mais prevalentes e causadoras de morbimortalidade no cenário atual brasileiro (DUNCAN et al., 2012), a importância dessa pesquisa se dá pela necessidade de conhecer mais sobre os mecanismos de atuação da PON1 e sua correlação com perfil lipídico em diferentes idades e sexo, para tentar relacionar aos eventos fisiológicos envolvidos em patologias associadas.

Considerando a importância dessa problemática para os seres humanos, a dificuldade e a falta de estudos sobre a atividade da PON1, a pergunta norteadora para o desenvolvimento desta pesquisa é: Existe diferença na atividade da PON1 e no perfil lipídico plasmático e hepático entre *Rattus norvegicus* neonatos e adultos, machos e fêmeas?

As hipóteses propostas neste projeto de pesquisa são:

- Existem diferenças na atividade da PON1 e no perfil lipídico entre sexo e idade (neonatos e adultos);
- Existe correlação entre PON1 e índices somáticos ou perfil lipídico entre sexo e idade (neonatos e adultos).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Associar a atividade plasmática da PON1 com índices somáticos e perfil lipídico plasmático em relação à idade e ao sexo em *Rattus norvegicus*.

2.2 Específicos

Avaliar em machos e fêmeas, adultos e neonatos:

- O perfil lipídico plasmático;
- A atividade plasmática da PON1;
- Os índices lipossomático (ILS) do TABr e hepatossomático (IHS);
- A concentração de triacilgliceróis hepáticos;
- A correlação entre a atividade da PON1 plasmática e a concentração plasmática de lipídios ou com os índices somáticos;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Dislipidemia e Fisiopatologia

Do ponto de vista fisiológico e clínico, os lipídeos biologicamente mais relevantes são os fosfolipídeos, o colesterol, os TGC e os ácidos graxos. Os fosfolipídeos formam a estrutura básica das membranas celulares. O colesterol é precursor dos hormônios esteróides, dos ácidos biliares e da vitamina D. Além disso, como constituinte das membranas celulares, o colesterol atua na fluidez destas e na ativação de enzimas localmente situadas. Os TGC são formados a partir de três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol e constituem uma das formas de armazenamento energético mais importante no organismo, sendo depositados nos tecidos adiposo e muscular (SBC, 2017).

As lipoproteínas são compostas por lipídeos e proteínas denominadas apolipoproteínas (Apo). As lipoproteínas são classificadas em dois grupos: as ricas em TGC, maiores e menos densas, representadas pelos quilomícrons, de origem intestinal, e pelas VLDL, de origem hepática; e as ricas em colesterol, incluindo as LDL e as HDL (SBC, 2017). Além das diferenças em tamanho, densidade e composição química, as lipoproteínas podem diferir em relação à modificação *in vivo* por oxidação, glicação ou dessialização. Estas modificações influenciam em seu papel no metabolismo lipídico e no processo aterogênico (SBC, 2017).

A dislipidemia é uma doença metabólica caracterizada pela elevação dos níveis plasmáticos de LDL, redução dos níveis de HDL e/ou aumento de TGC. São classificadas como primárias as de origem genéticas, ou secundárias causadas por outras doenças como: hipotireoidismo, *Diabetes mellitus*, obesidade, alcoolismo, ou uso indiscriminado de medicamentos como diuréticos, betabloqueadores, corticosteroides ou anabolizantes (SBC; SBH; SBN, 2010). As alterações no metabolismo das lipoproteínas aumentam o risco para as doenças cardiovasculares, as quais apresentam um importante desfecho crônico, sendo responsáveis por 30% do total de mortes no mundo (RODRIGUES; PETRUZELLIS; BOCK, 2013). Além disso, sexo e idade são fatores de risco não modificáveis, significativos em relação às dislipidemias, pois os níveis de lipídeos e lipoproteínas têm variações importantes durante a fase de crescimento humano, e também com a diferença entre os sexos (OLIVEIRA et al., 2017). Deste modo, a detecção precoce das dislipidemias pode contribuir de forma efetiva para reduzir o desenvolvimento prematuro de eventos coronarianos por aterosclerose (MORAES; CHECCHIO; FREITAS, 2013; RODRIGUES; PETRUZELLIS; BOCK, 2013).

A aterosclerose é uma patologia que envolve mecanismos complexos, dentre os quais, destacam-se a disfunção endotelial gerada principalmente pelo estresse oxidativo (LI; PAGANO, 2017) e, por conseguinte, a relação dos produtos gerados durante os processos de peroxidação lipídica com alterações nas partículas de LDL (ABDALLA; SENA, 2008). O HDL tem propriedade anti-aterogênica que está relacionada ao transporte reverso do colesterol, estabilização da placa aterosclerótica, e efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (PODREZ, 2010). O HDL tem outras ações que contribuem para a proteção do leito vascular contra a aterogênese, como a remoção de lipídeos oxidados da LDL, a inibição da fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio, e a estimulação da liberação de óxido nítrico (SBC, 2017).

3.2 Estresse Oxidativo

Os radicais livres, produtos gerados pelos processos metabólicos celulares, são espécies químicas que possuem um único elétron não pareado em sua órbita externa (KUMAR et al., 2010). O aumento excessivo de radicais livres tem efeitos danosos. Com a presença de oxigênio, os radicais livres causam a peroxidação dos lipídeos de membranas plasmáticas e organelas, sendo que as interações de espécies reativas de oxigênio com lipídeos geram peróxidos, com consequente apoptose celular (KUMAR et al., 2010).

Quando a produção de radicais livres excede a capacidade das defesas antioxidantes do corpo ocorre uma condição conhecida como estresse oxidativo. Os radicais livres podem causar danos nos tecidos, particularmente no tecido endotelial (KONTA; BYKLEBLEBICI, 2012).

3.3 PON1 - Mecanismo de ação e funções

Paraoxonases são moléculas que pertencem a uma família de enzimas desintoxicantes compostas de três membros: PON1, PON2 e PON3. Estas enzimas compartilham uma semelhança de 60-65% no nível de aminoácidos (PRIMO-PARMO et al., 1996). O nome da família (Paraoxonases) vem da habilidade da PON1, a mais estudada das três isoformas, de catalisar a hidrólise e posterior inativação de inseticidas e neurotoxinas, como os paraoxons e outros organofosforados, em produtos não tóxicos (ECKERSON; WYTE; LA DU, 1983; LA DU, 1996).

O produto do gene da PON1 é uma estearase dependente do cálcio, associada à apolipoproteína (Apo) A1 na lipoproteína de alta densidade (HDL). PON1 é capaz de prevenir a oxidação de LDL pela hidrólise de peróxidos lipídicos na lipoproteína. Após ser sintetizada no fígado, a PON1 é liberada para o plasma e a maior parte desta enzima encontra-se ligada a proteína HDL (Figura 1) (VLACHOS et al., 2006). Uma pequena quantidade foi encontrada associada a proteínas de muito baixa densidade (VLDL), quilomicrons pós-prandiais, também livres no plasma (DRAGANOV; LA DU, 2004).

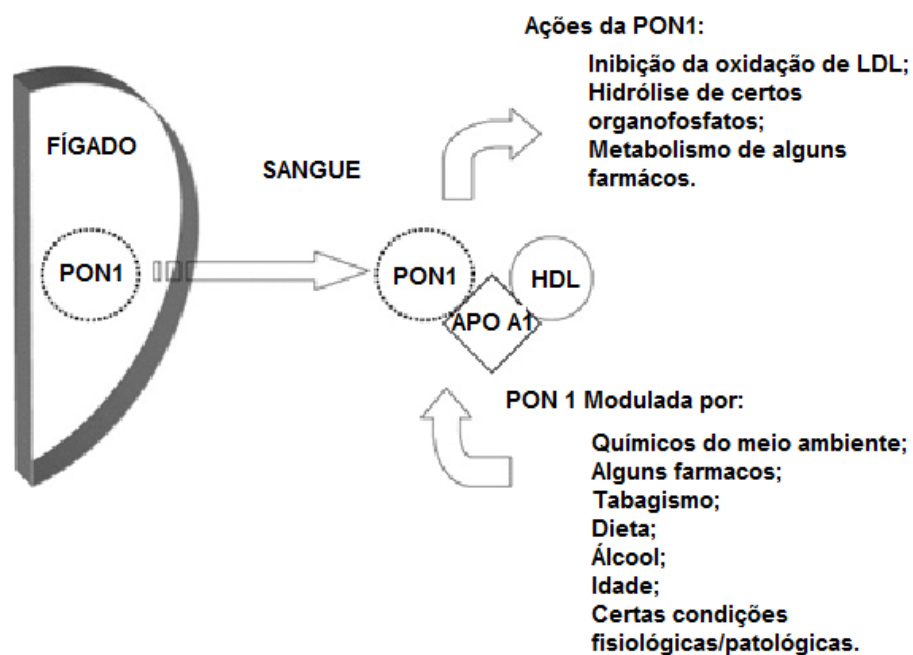


Figura 1 – Secreção e ligação da PON1 em mamíferos (adaptado de COSTA et al, 2005).

Estudos recentes sugerem a associação das dislipidemias com a atividade da PON1 plasmática, sendo que quanto menor a atividade da PON1, maior o nível de TGC e LDL e menores as taxas de HDL séricos (CHERAGHI et al., 2017; FRIDMAN et al., 2016). Baixas concentrações de PON1 no soro estão associadas a muitas doenças com grande componente inflamatório incluindo *Diabetes mellitus*, Artrite Reumatoide, Lúpus Eritematoso Sistêmico e várias doenças hepáticas e renais incluindo Insuficiência Renal, Psoríase e Degeneração Macular (GOSWAMI et al., 2009).

As enzimas Paraoxonases (PONs) mostraram desempenhar um papel importante no metabolismo lipídico e, portanto, no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (LI; LIU; LIANG, 2003). Foi demonstrado em ratos que baixos níveis séricos da PON1 estão

associados a uma maior susceptibilidade à oxidação do LDL e a um risco aumentado de desenvolvimento de aterosclerose (SHIH et al., 1996). Estudos experimentais com humanos sugerem que as PONs reduzem o risco de doença cardíaca coronária, evitando a oxidação de LDL e HDL envolvidas na iniciação e progressão de lesões ateroscleróticas (MACKNESS; DURRINGTON; MACKNESS, 2002). Além disso, foi demonstrado que a PON1 correlaciona-se negativamente com o risco de doenças cardiovasculares em humanos, devido à função antioxidativa do HDL (DEAKIN et al., 2011; MACKNESS; MACKNESS, 2015).

O perfil de lipoproteínas dos neonatos difere daquele dos adultos (STOZICKÝ; SLABÝ; VOLENIKOVÁ, 1982), sendo que os neonatos humanos contêm muito pouco VLDL e LDL (GUGLIUCCI; MENINI, 2015). Estudos realizados com os neonatos humanos demonstraram que a atividade da PON1 é menor em neonatos do que em adultos, o que pode ser associado com a diminuição das defesas antioxidantes em neonatos prematuros (ALTUNHAN et al., 2013). Além disso, existe uma diminuição progressiva da atividade de PON1 em idosos (JARVIK et al., 2002). Este declínio na atividade PON1 pode ser relacionado ao desenvolvimento de condições ligadas a um aumento do estresse oxidativo com o envelhecimento e a aterosclerose (SORAN et al., 2009).

Apesar da íntima relação da PON1 com HDL, não há, na população infantil, associações significativas entre atividade da enzima e níveis séricos de lipídeos (SUMEGOVÁ et al., 2007). Neonatos têm uma atividade muito baixa de lactonase PON1, o que pode explicar, em parte, o conhecido estado imunodeficiente relativo e a susceptibilidade ao estresse oxidativo dos recém-nascidos, ou refletir a baixa necessidade relativa de PON1 em um metabolismo pelo qual as concentrações de VLDL e LDL são muito baixas (GUGLIUCCI; MENINI, 2015).

4 MÉTODO

4.1 Tipo de Estudo

O estudo experimental utiliza animais para a coleta de dados (HOCHMAN et al., 2005). Abordagem é considerada quantitativa quando ocorrem coleta e análise de dados quantitativos sobre variáveis, identificando a natureza profunda das realidades, seu sistema de relações e sua estrutura dinâmica. A pesquisa quantitativa também pode determinar a força de associação ou correlação entre variáveis, a generalização e objetivação dos resultados por meio de uma amostra que faz inferência a uma população. Além do estudo da associação ou correlação, a pesquisa quantitativa também pode, ao seu tempo, fazer inferências causais que explicam por que as coisas acontecem ou não de uma forma determinada (ESPERÓN, 2017).

4.2 Local do Estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.3 População e Amostra

Os animais utilizados em ambos os experimentos foram ratos *Wistar* da espécie *Rattus norvegicus*. O cálculo do tamanho amostral foi efetuado utilizando-se o *software G*Power 3.1.9.2*[®] (Schleswig-Holstein, Alemanha), sendo considerada uma probabilidade de erro $\alpha=0,05$ e poder do teste estatístico=0,80. Para a estimativa amostral, foram considerados os resultados de protocolos experimentais do LaMEC e de outros grupos de pesquisa que utilizaram protocolos semelhantes (COZER et al., 2017). Desta forma, como amostra final obteve-se 65 animais, sendo 21 ratos neonatos, com 07 dias de vida (10 fêmeas e 11 machos), 24 ratos neonatos, com 14 dias de vida (11 fêmeas e 13 machos), e 20 ratos adultos, com 70 dias de vida (10 fêmeas e 10 machos).

4.4 Variáveis do Estudo

As seguintes variáveis foram estudadas:

- IHS (peso fígado/peso do animal);
- ILS retroperitoneal/visceral (peso do TABr/peso do animal);
- Atividade da enzima PON1 sérica;
- Concentrações séricas e hepáticas de Triacilgliceróis (TGC), e concentrações séricas de glicose, Colesterol Total (CT) e HDL.

4.5 Coleta de Dados

Todos os ratos utilizados no estudo foram obtidos do Centro de Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) localizado no Campus do Vale da UFRGS e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia do ICBS da UFRGS. Os animais foram mantidos em ciclos claro/escuro de 12/12h em salas climatizadas ($\pm 22^{\circ}\text{C}$). O monitoramento dos animais foi realizado diariamente, possibilitando a identificação de alterações relacionadas à saúde e ao conforto dos mesmos. As instalações utilizadas apresentam-se em conformidade com a Lei Arouca nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008) e apresentam credenciamento e acompanhamento do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.5.1 Animais neonatos

Foram solicitadas ratas-mães com os filhotes (em seu segundo dia de vida), para que houvesse um período de aclimação dos animais até 07 ou 14 dias de vida (dia do experimento).

As proles (de ambos os sexos) foram utilizadas em número máximo de 8 filhotes por ninhada, conforme as regras informais do CREAL. Os filhotes foram mantidos em gaiolas-padrão no biotério setorial de farmacologia, juntamente com suas respectivas mães. No dia do experimento, as ratas-mães foram eutanasiadas com uma sobredose de Isoflurano[®] (Biochimico; Brasil), grau de severidade: sem retorno, e descartadas.

4.5.2 Animais adultos

Os ratos adultos de 70 dias foram mantidos em gaiolas plásticas, com no máximo três ratos por gaiola e foram alimentados com ração padrão para roedores - Nuvilab CR1® (Nutival - Brasil) e água *ad libitum* durante todas as etapas do projeto. As fêmeas tiveram acompanhamento prévio para a confirmação da variação cíclica da morfologia das células do epitélio vaginal característica da maturidade reprodutiva. Foram utilizadas apenas fêmeas em diestro, fase secretora ou lútea do ciclo reprodutivo, onde o ciclo tem maior duração (SANTOS, 2002), para que as variações hormonais fossem mais próximas aos machos.

4.5.3 Eutanásia

Os animais foram mortos por decapitação em guilhotina para roedores, sem anestesia, para obtenção do sangue total e dos tecidos. O método escolhido para eutanásia baseou-se no fato deste ser um método eficaz que produz alterações fisiológicas mínimas nos tecidos. Considerando a necessidade de obtenção de sangue periférico e realização de análises celulares e bioquímicas, nenhum anestésico ou outra substância foi injetado nos animais por ocasião da decapitação.

É importante salientar que foram realizadas dosagens bioquímicas que poderiam ser alteradas pela utilização de anestésicos. Qualquer fármaco utilizado como anestésico poderia causar alteração na homeostase metabólica. Essa forma de eutanásia é utilizada por pesquisadores da área de metabolismo de diversos países e aceita pelas revistas internacionais indexadas e de alto impacto (BROWN et al., 2005; SAHA et al., 2005).

Os animais foram mantidos em uma sala no LaMEC separada daquela onde ocorreu a decapitação e os experimentos, em ambiente tranquilo, com temperatura controlada e água *ad libitum*. Após a morte de cada animal, a guilhotina e a bancada foram higienizadas.

Os procedimentos de eutanásia foram realizados conforme o guia de eutanásia da *Guide to the Care and Use of Experimental Animals from the Canadian Council on Animal Care* (1993). Segundo a revisão da diretiva europeia 86/609/EEC (COMMISSION EUROPÉENNE, 2009), que classifica os graus de severidade dos procedimentos laboratoriais com animais, o procedimento de eutanásia é definido como sem recuperação.

4.6 Procedimentos Experimentais

4.6.1 Índices somáticos, coleta e armazenamento dos tecidos

No dia do experimento, cada rato foi pesado antes da eutanásia. Os ratos foram guilhotinados, com guilhotina adequada para o tamanho do animal. Imediatamente após a decapitação, o sangue, o TABr e o tecido hepático foram excisados, pesados, colocados em tubos apropriados e congelados em nitrogênio líquido. Os tecidos foram conservados a -80°C até a utilização.

O sangue foi coletado em tubos com ativador de coagulação e centrifugado a 420g por 10 minutos, para separação do soro. As amostras de soro foram congeladas a -80°C até sua utilização.

4.6.2 Análises bioquímicas

O tecido hepático foi homogeneizado em solução fisiológica gelada. Uma alíquota do homogeneizado foi utilizada para as dosagens bioquímicas. As concentrações séricas de TGC, CT, glicose e HDL foram quantificados por kits comerciais (Labtest®), seguindo protocolo do fabricante. O TGC do tecido hepático foi quantificado de acordo com Rocha et al., (2018).

A análise da PON 1 sérica foi realizada segundo Browne e cols. (2007) e foi medida pela taxa de formação de fenol. O reagente de trabalho consistiu em 20 mmol/L Tris/HCl, pH 8,0, contendo 1 mmol/L de CaCl_2 e 4 mmol/L de acetato de fenil como substrato. As amostras foram diluídas 1: 3 em 20 mmol/L de tampão Tris/HCl e foram adicionados ao reagente de trabalho, sendo que as alterações na absorbância a 270nm foram registradas durante 60s. A atividade foi expressa em U/mL, com base na absortividade molar do fenol a 270nm.

4.7 Análise dos Dados

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância de duas vias (Two Way ANOVA) seguida do *post hoc* Bonferroni. Os dados não paramétricos foram avaliados por Mann Whitney e Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. A significância aceita foi de $p < 0,05$ e os testes foram realizados utilizando o programa Prisma versão 6.0. Foi realizada correlação de *Pearson* entre atividade da PON1 e concentração de HDL plasmáticos.

Os dados foram apresentados por meio de tabelas ou gráficos. Para os dados paramétricos foram utilizados a média e o erro padrão da média, e para os dados não-paramétricos, a mediana e o intervalo interquartil (CALLEGARI-JAQCUES, 2003).

4.8 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Resolução Normativa nº13, de 20 de setembro de 2013 (BRASIL, 2013), Resolução Normativa nº30, de 02 de fevereiro de 2016 do CONCEA (BRASIL, 2016) e conforme a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008), que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais, além dos princípios internacionais para a prática envolvendo animais, constantes no *Guide to the Care and Use of Experimental Animals from the Canadian Council on Animal Care* (1993).

O projeto foi aprovado pela Comissão de Pesquisa (COMPESQ) do ICBS e, posteriormente, pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFRGS (nº do projeto 34595).

4.9 Proteção ao Pesquisador e Descarte de Resíduos

Durante a realização dos procedimentos cirúrgicos e experimentais propostos, os pesquisadores utilizaram luvas e aventais para proteção. Sempre que necessário também foram utilizados óculos de proteção e máscaras. A preparação de soluções tóxicas ou possivelmente perigosas ocorreu dentro da capela.

O descarte de resíduos não-tóxicos e não-contaminantes ocorreu no sistema de esgoto comum. Outros resíduos foram encaminhados ao Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para correta eliminação. Os resíduos de amostras biológicas foram congelados no próprio laboratório até o recolhimento. As luvas e os demais materiais que contenham resíduos biológicos, bem como materiais perfuro cortantes, foram devidamente separados, embalados e identificados antes do recolhimento.

As carcaças dos animais mortos foram colocadas em sacos plásticos brancos identificados e foram congeladas até o momento de serem encaminhadas ao CREAL da UFRGS para correta destinação final, realizada por empresa terceirizada (responsável pelo serviço de recolhimento e processamento do material em questão).

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, D. S. P.; SENA, K. C. M. Biomarcadores de peroxidação lipídica na aterosclerose. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 21, n. 6, p.749-756, dez. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732008000600013>. Acesso em: 17 out. 2017.
- ALBERTI, K. G. M. M. et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, Dallas, v. 120, n. 16, p. 1640-1645, 5 Oct. 2009. Disponível em: <<http://circ.ahajournals.org/content/120/16/1640>>. Acesso em: 23 out. 2017.
- ALTUNHAN, H. et al. Total oxidant, antioxidant, and paraoxonase levels in babies born to pre-eclamptic mothers. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, Tokyo, v. 39, n. 5, p. 898-904, May 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jog.12026/epdf>>. Acesso em: 23 nov. 2017.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. **AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals**: 2013 Edition. Schaumburg: American Veterinary Medical Association, 2013. Disponível em: <<https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>>. Acesso em: 23 nov. 2017.
- BRASIL. **Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm>. Acesso em 22 nov. 2017.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Resolução Normativa nº 30, de 2 de fevereiro de 2016**. Brasília, 2016. Disponível em: <https://ww2.icb.usp.br/icb/wp-content/uploads/bioterio_etica/RESOLUCAO_NOR_30.pdf> Acesso em: 20 nov. 2017.
- _____. **Resolução Normativa CONCEA nº 13, de 20.09.2013**. Brasília, 2013. Disponível em: <<http://www.agrarias.ufpr.br/portal/wp-content/uploads/2015/02/RN13-2013-Diretrizes-para-pr%C3%A1tica-de-eutan%C3%A1sia-dos-animais.pdf>> Acesso em: 20 nov. 2017.
- BROWN, E. T. et al. Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice. **Visual Neuroscience**, Cambridge, v. 22, n. 05, p. 615-618, Sept. 2005. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/50457982E5846EDE629D2E665A57C2C2/S0952523805225105a.pdf/anesthesia_can_cause_sustained_hyperglycemia_in_c57bl6j_mice.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2017.
- CALLEGARI-JACQUES, S. M. Organização de dados quantitativos. In: CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003. cap. 2, p. 20-32.

CÁRNIO, E. C. As ciências básicas e a enfermagem [Editorial]. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 19, n. 5, set./out. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rlae/v19n5/pt_01.pdf>. Acesso em: 25 dez. 2017.

CHERAGHI, M. et al. Paraoxonase 1 Activity, Lipid Profile, and Atherogenic Indexes Status in Coronary Heart Disease. **Biochemistry & Molecular Biology**. [s.l.], v. 1, n. 6, p. 1-7, Oct. 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Hassan_Ahmadvand/publication/313037189_Paraoxonase_1_Activity_Lipid_Profile_and_Atherogenic_Indexes_Status_in_Coronary_Heart_Disease/links/588e1b6792851cef1362c8b1/Paraoxonase-1-Activity-Lipid-Profile-and-Atherogenic-Indexes-Status-in-Coronary-Heart-Disease.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2017.

COMMISSION EUROPÉENNE. **Expert working group on severity classification of scientific procedures performed on animals: final report**. Brussels: Commission Européenne, 2009. Disponível em: <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/report_ewg.pdf>. Acesso em: 21 nov. 2017.

COSTA, L. G. et al. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. **Biochemical Pharmacology**, Amsterdam, v. 69, n. 4, p.541-550, fev. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295204006197?via=ihub>>. Acesso em: 27 dez. 2017.

COZER, A. G. et al. Effects of Stanniocalcin-1 on glucose flux in rat brown adipose tissue. **Biochimie**, Paris, v. 138, p. 50-55, July. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2017.04.008>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

DEAKIN, S. P. et al. HDL-associated paraoxonase-1 can redistribute to cell membranes and influence sensitivity to oxidative stress. **Free Radical Biology And Medicine**, New York, v. 50, n. 1, p.102-109, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez45.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0891584910005344?via=ihub>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

DRAGANOV, D. I.; LADU, B. N. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. **Naunyn-schmiedeberg's Archives Of Pharmacology**, [s.l.], v. 369, n. 1, p.78-88, 1 jan. 2004. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00210-003-0833-1>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

DUNCAN, B. B. et al. Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 46, supl., p. 126-134, nov. 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v46s1/17.pdf>>. Acesso em: 21 nov. 2017.

ECKERSON, H. W.; WYTE, C. M.; LADU, B. N. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. **American Journal Of Human Genetics**. Chicago, p. 1126-1138. Feb. 1983. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez45.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC1685985/#>>. Acesso em: 06 out. 2017.

ESPERÓN, J. M. T. Quantitative Research in Nursing Science. **Escola Anna Nery - Revista de Enfermagem**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p.1-2, 2017. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1414-81452017000100101>. Acesso em: 9 out. 2017.

FRIDMAN, O. et al. Paraoxonase 1 gene polymorphisms and enzyme activities in coronary artery disease and its relationship to serum lipids and glycemia. **Archivos de Cardiología de México**, México, v. 86, n. 4, p. 350-357, Oct./Dec. 2016. Disponível em: <<http://www.elsevier.es/es-revista-archivos-cardiologia-mexico-293-linkresolver-paraoxonase-1-gene-polymorphisms-enzyme-S1405994016300751>>. Acesso em: 30 out. 2017.

GOSWAMI, B. et al. Paraoxonase: A multifaceted biomolecule. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 410, n. 1-2, p.1-12, dez. 2009. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S0009898109004926/1-s2.0-S0009898109004926-main.pdf?_tid=4cea15d4-ea56-11e7-9a7e-00000aab0f6c&acdnat=1514304384_5865ee3aa5fb09ff90daaed7a159fe3c>. Acesso em: 25 dez. 2017.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. Paraoxonase 1 and HDL maturation. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 439, p. 5-13, Jan. 2015. Disponível em: <<http://wp.ufpel.edu.br/renataabib/files/2017/08/Gugliucci2015.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

HOCHMAN, B. et al. Desenhos de pesquisa. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 20, Supl. 2, p. 2-9, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502005000800002>. Acesso em: 15 out. 2017.

JARVIK, G. P.. Vitamin C and E Intake Is Associated With Increased Paraoxonase Activity. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, Dallas, v. 22, n. 8, p.1329-1333, 20 jun. 2002. Disponível em: <<http://atvb.ahajournals.org/content/22/8/1329.long>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

KONTA, T.; BYKLEBLEBICI, O. Paraoxonase: A New Biochemical Marker of Oxidant-Antioxidant Status in Atherosclerosis. **Oxidative Stress - Molecular Mechanisms And Biological Effects**, [s.l.], p.145-154, 25 abr. 2012. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-molecular-mechanisms-and-biological-effects/paraoxonase-a-new-biochemical-marker-of-oxidant-antioxidant-status-in-atherosclerosis>>. Acesso em: 12 out. 2018.

KUMAR, V. et al. **Robbins & Contran Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LA DU, B. N. Structural and functional diversity of paraoxonases. **Nature Medicine**, New York, v. 2, n. 11, p.1186-1187, Nov. 1996. Disponível em: <<http://www-nature.ez45.periodicos.capes.gov.br/articles/nm1196-1186.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2017.

LI, H.; LIU, D.; LIANG, C. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. **Journal Of Molecular Medicine**, Heidelberg, v. 81, n. 12, p.766-779, 1 dez. 2003. Disponível em: <<https://link.springer-com.ez45.periodicos.capes.gov.br/content/pdf/10.1007/s00109-003-0481-4.pdf>>. Acesso em: 25 dez. 2017.

LI, Y.; PAGANO, Patrick J.. Microvascular NADPH oxidase in health and disease. **Free Radical Biology and Medicine**, Holanda, v. 109, p.33-47, ago. 2017. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S0891584917301211/1-s2.0-S0891584917301211-main.pdf?_tid=41e24bf8-ebd1-11e7-9000-00000aab0f6c&acdnat=1514467153_fd4c510bcde5b6c621afd4d99b9462b1>. Acesso em: 25 dez. 2017.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P. N.; MACKNESS, M. I. The paraoxonase gene family and coronary heart disease. **Current Opinion In Lipidology**, London, v. 4, n. 13, p.357-362, ago. 2002. Disponível em: <http://ovidsp.tx.ovid.com/ovftpdfs/FPDDNCJCLDKDMO00/fs013/ovft/live/gv003/00041433/0004143320020800000002.pdf&filename=The+paraoxonase+gene+family+and+coronary+heart+disease.&pdf_key=FPDDNCJCLDKDMO00&pdf_index=/fs013/ovft/live/gv003/00041433/00041433-200208000-00002>. Acesso em: 25 dez. 2017.

MACKNESS, B. et al. Low Paraoxonase Activity Predicts Coronary Events in the Caerphilly Prospective Study. **Circulation**, Dallas, v. 107, n. 22, p.2775-2779, 10 jun. 2003. Disponível em: <http://ovidsp.tx.ovid.com/ovftpdfs/FPDDNCLBABHKNH00/fs033/ovft/live/gv017/00003017/0000301720030610000017.pdf&filename=Low+Paraoxonase+Activity+Predicts+Coronary+Events+in+the+Caerphilly+Prospective+Study.&pdf_key=FPDDNCLBABHKNH00&pdf_index=/fs033/ovft/live/gv017/00003017/00003017-200306100-00017>. Acesso em: 10 nov. 2017.

MACKNESS, M.; MACKNESS, B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. **Gene**, Amsterdam, v. 567, n. 1, p.12-21, Aug. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4458450/>>. Acesso em: 29 nov. 2017.

MORAES, S. A.; CHECCHIO, M. V.; FREITAS, I. C. M. Dislipidemia e fatores associados em adultos residentes em Ribeirão Preto, SP. Resultados do Projeto EPIDCV. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 9, n. 57, p.691-701, dez. 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abem/v57n9/a04v57n9.pdf>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

MOREIRA, Estefania Gastaldello et al. Lowered PON1 activities are strongly associated with depression and bipolar disorder, recurrence of (hypo) mania and depression, increased disability and lowered quality of life. **The World Journal Of Biological Psychiatry**, Estados Unidos, p.1-13, 30 maio 2017. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15622975.2017.1322219?journalCode=iwbp20>>. Acesso em: 30 dez. 2017.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THE NATIONAL ACADEMIES. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. Washington: National Research Council of the

National Academies, 2011. Disponível em: <<https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>> Acesso em: 30 nov. 2017.

OLIVEIRA, L. B. et al. Prevalência de dislipidemias e fatores de risco associados. **Journal Of Health & Biological Sciences**, Fortaleza, v. 5, n. 4, p.320-325, 3 out. 2017. Disponível em: <<http://periodicos.unichristus.edu.br/index.php/jhbs/article/view/1306/475>>. Acesso em: 23 dez. 2017.

PODREZ, A. Anti-oxidant properties of high-density lipoprotein and atherosclerosis. **Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology**, Oxford, v. 37, n. 7, p.719-725, 30 mar. 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary-wiley.ez45.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1111/j.1440-1681.2010.05380.x/epdf>>. Acesso em: 23 dez. 2017.

PRIMO-PARMO, S. L. et al. The Human Serum Paraoxonase/Arylesterase Gene (PON1) Is One Member of a Multigene Family. **Genomics**, San Diego, v. 33, n. 3, p.498-507, may 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754396902256?via=ihub>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

REPÁRAZ, F. et al. Perfil lipídico: evolución, tendencia y seguimiento desde la infancia a la edad adulta. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**. Navarra, v. 21, n. 2, p. 155-165, Mayo/Agosto 1998. Disponível em: <<https://recyt.fecyt.es/index.php/ASSN/article/view/7384/9134>>. Acesso em: 10 out. 2017.

ROCHA, Débora Santos et al. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on the metabolism of diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 105, p.370-376, set. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0753332218302087?via%3Dihub>>. Acesso em: 07 fev. 2018.

RODRIGUES, Fernanda Maciel; PETRUZELLIS, Editiane Alcântara; BOCK, Patricia Martins. Avaliação do perfil de usuários de hipolipemiantes de uma drogaria em Porto Alegre RS. **Revista Saúde**, Santa Maria, v. 2, n. 39, p.149-160, dez. 2013. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/revistasaude/article/view/7255/pdf>>. Acesso em: 20 out. 2017.

SAHA, J. K. et al. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. **Experimental Biology and Medicine**. v. 230, n. 10, p. 777-784, Nov. 2005.

SANTOS, B. F. Criação e Manejo de Ratos. In: ANDRADE, A. et al. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. p. 119-121. Disponível em: <<https://static.scielo.org/scielobooks/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869.pdf>>. Acesso em: 01 dez. 2017.

SANTOS, M. C. B. dos et al. Hábitos e perfil socioeconômico do paciente aterosclerótico no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, Brasília, v. 3, n. 22, p. 247-256, jun. 2011. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/revista_ESCS_v22_n3_a07_habitos_perfil_socioeconomico.pdf>. Acesso em: 28 out. 2017.

SHIH, D M et al. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. **Journal Of Clinical Investigation**, New York, v. 97, n. 7, p.1630-1639, 1 abr. 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC507227/pdf/971630.pdf>>. Acesso em: 25 dez. 2017.

SBAC (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS). **Consenso Brasileiro para a Normatização da Determinação Laboratorial do Perfil Lipídico**. Rio de Janeiro 2016. 5 p. Disponível em: <http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/consenso_jejum_dez2016_final.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2017.

SBC (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA). Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose - 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v.109, n.1, 2017 Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abc/v109n2s1/0066-782X-abc-109-02-s1-0001.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2017.

SBC (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA), SBH (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO) E SBN (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA). VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 95, n. 1, p.1-51, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2010001700001>. Acesso em: 29 dez. 2017.

SORAN, Handrean et al. Variation in paraoxonase-1 activity and atherosclerosis. **Current Opinion In Lipidology**, Londres, v. 20, n. 4, p.265-274, ago. 2009. Disponível em: <<https://insightsovid.ez45.periodicos.capes.gov.br/pubmed?pmid=19550323>>. Acesso em: 28 dez. 2017.

STOZICKÝ, F; SLABÝ, P; VOLENIKOVÁ, L. The pattern of major serum apolipoproteins during the early neonatal period. **Acta Paediatrica Scandinavica**, Stockholm, v. 2, n. 71, p.154-160, mar. 1982.

STRAKOVSKY, R. S. et al. The regulation of hepatic Pon1 by a maternal high-fat diet is gender specific and may occur through promoter histone modifications in neonatal rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 25, n. 2, p. 170-176, Feb. 2014. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S095528631300226X/1s2.0-S095528631300226Xmain.pdf?_tid=5d5e5016eb0911e7bc5b00000aab0f02&acdnat=1514381291_95bc3d3836d9f84023a6f5a87ec28822>. Acesso em: 10 nov. 2017.

SUMEGOVÁ, K. et al. Activity of paraoxonase 1 and lipid profile in healthy children. **Physiological Research**, Praga, v. 3, n. 56, p.351-357, jun. 2007. Disponível em: <http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/56/56_351.pdf>. Acesso em: 29 dez. 2017.

VLACHOS, G. D. et al. Maternal–neonatal serum paraoxonase 1 activity in relation to the mode of delivery. **Clinical Biochemistry**, New York, v. 39, n. 9, p. 923-928, Sept. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912006001536?via=ihub>>. Acesso em: 12 out. 2017.

ARTIGO

Conforme normas da revista (ANEXO III)

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology

Título: ESTUDO DA ATIVIDADE DA PON-1 E PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO EM RATOS (*Rattus norvegicus*) NEONATOS E ADULTOS, MACHOS E FÊMEAS.

Autores: Diane Silveira¹⁻², Márcia Breigeiron Koja¹, Marcia Trapp²

¹Curso de Graduação em Enfermagem, Escola de Enfermagem, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

²Departamento de Fisiologia, Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), UFRGS.

Autor correspondente:

Marcia Trapp

E-mail: mtrapp@ufrgs.br

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 500. Bairro Centro, ICBS, UFRGS. Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefone: +55 51 3308.3960

Resumo

Paraoxonase 1 (PON1) é uma esterase ligada à lipoproteína de alta densidade (HDL) plasmática e com menor atividade em neonatos. Baixas concentrações plasmáticas de PON1 estão associadas a doenças inflamatórias. O objetivo foi associar a atividade plasmática da PON1 com o perfil lipídico plasmático em relação à idade e ao sexo em *Rattus norvegicus*. Amostras de 65 ratos neonatos, 7(P7) e 14(P14) dias de vida, e adultos foram estudadas. Atividade da PON1, concentração de HDL, Colesterol Total (CT), Triacilglicerol (TGC), glicose séricos e índices hepatossomático (IHS) e lipossomático (ILS) foram avaliados. Atividade da PON1 e concentração de HDL foram modificados de acordo com a idade (superior para adultos) e sexo (superior para fêmeas adultas). Contudo, houve correlação positiva entre PON1 e HDL somente em machos adultos e P14. CT foi superior em neonatos comparados aos adultos. TCG foi maior em neonatos machos P14 comparado aos P7, e glicose foi maior em neonatos P14 comparado aos P7 e adultos. Maior IHS e menor ILS foram encontrados em fêmeas adultas. A maior atividade da enzima associada a elevados valores de HDL em fêmeas pode estar relacionada a um perfil protetor para doenças inflamatórias.

Palavras-chave: PON1, Paraoxonase 1, Male, Female, HDL Cholesterol, Triglycerides, *Rattus norvegicus*, Adults, Neonates.

Abstract

Paraoxonase 1 (PON1) is an esterase connected, in most times, to the plasmatic high-density lipoprotein (HDL), which has lower activity in neonates. Low plasma concentrations of PON1 are associated with inflammatory diseases. We aimed to associate the PON1 plasma activity with the plasma lipid profile in relation to age and sex in *Rattus norvegicus*. The sample was composed by 65 neonatal rats with 7 (P7) and 14 (P14) days of life, being adults also studied. Activity of PON1, HDL concentration, Total Cholesterol (TC), Triacylglycerol (TGC), serum glucose, hepatosomatic (IHS) and liposomal indexes (ILS) were evaluated. Activity of PON1 and HDL concentration changed according to age (higher for adults) and sex (higher for adult females). However, there was a positive correlation between PON1 and HDL only in adult males and P14. TC was higher in neonates, when compared to adults. TGC was higher in male P14 neonates compared to P7, and glucose was higher in P14 neonates compared to P7 and adult. Higher IHS and lower ILS were found in adult females. The enzyme higher activity associated with high HDL values in females may be related to a protective profile for inflammatory diseases.

Keywords: PON1, Paraoxonase 1, Male, Female, HDL Cholesterol, Triglycerides, *Rattus norvegicus*, Adults, Neonates.

Introdução

Paraoxonase 1 (PON1) é atualmente classificada como uma arildialcilsfosfatase (EC 3.1.8.1) pela *Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. A PON1 é uma estearase dependente do cálcio, sintetizada no fígado e liberada no plasma, onde liga-se, na maioria das vezes, à apolipoproteína (Apo) A1 na lipoproteína de alta densidade (HDL). PON1 é capaz de prevenir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) pela hidrólise de peróxidos lipídicos na lipoproteína (Vlachos et al. 2006).

Estudos recentes sugerem a associação das dislipidemias com a atividade da PON1 plasmática, sendo que quanto menor a atividade da PON1, maior o nível de Triacilgliceróis (TGC) e de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e menores as taxas de HDL séricos (Cheraghi et al. 2017; Fridman 2016).

Baixas concentrações de PON1 no plasma estão associadas a muitas doenças com grande componente inflamatório incluindo *Diabetes mellitus*, Artrite Reumatoide, Lúpus Eritematoso Sistêmico, doenças hepáticas e renais incluindo Insuficiência Renal, Psoríase, Degeneração Macular (Goswami et al 2009) e doença cardiovascular (Durrington et al. 2001). As doenças cardiovasculares são a primeira causa de morte no mundo (Santos et al. 2011) e a oxidação da LDL na parede das artérias tem um papel importante na aterogênese (Durrington et al. 2001).

Nas placas ateroscleróticas, onde a peroxidação lipídica está aumentada, a PON 1 atua como um potente antioxidante (Strakovsky et al. 2014). PON1 apresenta uma relação inversa com o risco de doenças cardiovasculares em humanos (DEAKIN et al. 2011; Mackness and Mackness, 2015).

Em seres humanos, o perfil lipídico de crianças e adultos é dinâmico e diferente, distinto também entre homens e mulheres (Repáraz et al. 1998). O perfil de lipoproteínas dos

neonatos contém muito pouco VLDL e LDL (Gugliucci and Menini 2015) quando comparado aos adultos (Stozický et al. 1982). Estudos realizados com os neonatos demonstraram que a PON1 é menor do que em adultos, podendo estar associada com a diminuição das defesas antioxidantes em neonatos prematuros (Altunhan et al. 2013).

Sendo as doenças crônicas não transmissíveis as mais prevalentes e causadoras de morbimortalidade (Duncan et al. 2012), a importância dessa pesquisa se dá pela necessidade de conhecer mais sobre os mecanismos de atuação da PON1 e sua correlação com perfil lipídico em diferentes idades e sexo, para relacionar a eventos fisiopatológicos. O desenvolvimento de estudos básicos com modelos animais permite fornecer a base de conhecimento sobre esta temática.

Pelo acima exposto, os objetivos deste trabalho foram associar a atividade plasmática da PON1 com o perfil lipídico plasmático em relação à idade e ao sexo em *Rattus norvegicus* e investigar a existência de correlação entre a atividade da PON1 plasmática e concentração de HDL e índices somáticos (lipossomático - ILS e hepatossomático - IHS).

Material e Método

Animais

Foram utilizados 65 ratos Wistar da espécie *Rattus norvegicus*, sendo 21 ratos neonatos (10 fêmeas e 11 machos) com 07 dias de vida (P7), 24 ratos neonatos (11 fêmeas e 13 machos) com 14 dias de vida (P14) e 20 ratos adultos com 70 dias de vida (10 fêmeas e 10 machos). Os neonatos (P7 e P14) foram mantidos com as ratas-mãe até o momento da eutanásia.

Todos os ratos utilizados no estudo foram obtidos do Centro de Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL). Os animais foram mantidos em ciclos claro/escuro de 12h/12h em salas climatizadas ($\pm 22^{\circ}\text{C}$) e alimentados *ad libitum* com ração padrão do biotério (Nuvilab

CR1[®], Nutival - Brasil). O monitoramento dos animais foi realizado diariamente, possibilitando a identificação de alterações relacionadas à saúde e ao conforto dos mesmos.

As fêmeas tiveram acompanhamento prévio para a confirmação da variação cíclica da morfologia das células do epitélio vaginal característica da maturidade reprodutiva. Foram utilizadas apenas fêmeas em diestro, fase secretora ou lútea do ciclo reprodutivo, onde o ciclo tem maior duração (Santos 2002), para que não ocorresse nenhum viés quanto às variações hormonais das fêmeas.

A manutenção dos animais e os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFRGS (nº 34595) e realizados em conformidades com *Guide to the Care and Use of Experimental Animals from the Canadian Council on Animal Care* (Vol. 1, 2nd ed., 1993, available from the Canadian Council on Animal Care (CCAC), 190 O'Connor St, Suite 800, Ottawa, ON K2P 2R3, Canadá, or on their Web site at www.ccac.ca).

Análise dos pesos e índices somáticos

Os animais foram pesados no dia do experimento antes da eutanásia. Além disso, foram pesados o tecido hepático e o tecido adiposo branco retroperitoneal (TABr). Foram calculados o índice hepatossomático IHS (peso do fígado/peso do animal) e lipossomático ILS retroperitoneal / visceral (peso do TABr/peso do animal).

Procedimento experimental

Os animais foram mortos por decapitação em guilhotina para roedores, sem anestesia, para obtenção do sangue total e dos tecidos. Considerando a necessidade de obtenção de sangue periférico e realização de análises celulares e bioquímicas, nenhum anestésico ou outra substância foi injetado nos animais por ocasião da decapitação, com o intuito de não alterar resultados bioquímicos. Qualquer fármaco utilizado como anestésico poderia causar alteração na

homeostase metabólica. Essa forma de eutanásia é utilizada por pesquisadores da área de metabolismo de diversos países e aceita pelas revistas internacionais indexadas e de alto impacto (Brown et al. 2005; Saha et al. 2005).

O sangue foi coletado do tronco em tubos com ativador de coagulação e centrifugado a 420g por 10 minutos, para separação do soro. O tecido hepático foi excisado e juntamente com as amostras de soro foi congelado a -80°C até sua utilização.

Dosagens bioquímicas séricas e teciduais

As concentrações séricas de triacilgliceróis (TGC), colesterol total (CT), glicose e HDL foram quantificados por kits comerciais (Labtest®), seguindo protocolo do fabricante. O TGC do tecido hepático foi quantificado de acordo com Rocha et al. (2018).

Dosagem da PON1

PON1 é classificada como uma arildiacilfosfatase (EC 3.1.8.1). A análise da PON 1 sérica foi realizada segundo Browne et al (2007) e foi medida pela taxa de formação de fenol. O reagente de trabalho consistiu em 20 mmol/L Tris/HCl, pH 8,0, contendo 1 mmol/L de CaCl_2 e 4 mmol/L de acetato de fenil como substrato. As amostras foram diluídas 1: 3 em 20 mmol/L de tampão Tris/HCl e foram adicionados ao reagente de trabalho, sendo que as alterações na absorbância a 270nm foram registradas durante 60s. A atividade foi expressa em U/mL, com base na absortividade molar do fenol a 270 nm.

Análise dos Dados

A normalidade foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância de duas vias (Two Way ANOVA) seguida do *post hoc* Bonferroni. Os dados não-paramétricos foram avaliados por Mann Whitney e Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Foi realizada correlação de *Pearson* entre atividade da PON 1 e parâmetros séricos ou atividade da PON 1 e índices corporais. A significância aceita foi de

$p < 0,05$ e os testes foram realizados utilizando o programa GraphPad Prisma versão 6.0. Os dados paramétricos foram expressos como a média \pm erro padrão da média, e os dados não-paramétricos como mediana e intervalo interquartil (Callegari-Jacques 2003).

Resultados

A atividade da enzima Paraoxonase 1 (PON1) foi dez vezes maior em fêmeas adultas quando comparada a atividade em fêmeas P7, e sete vezes maior quando comparada a de fêmeas P14 ($P < 0,05$). Também, machos adultos apresentaram atividade da PON1 oito vezes maior do que machos P7, e sete vezes maior do que machos P14 ($P < 0,05$). Além disso, a atividade da PON1 foi maior em fêmeas adultas quando comparada a de machos adultos ($P < 0,05$) [Figura 1].

A concentração de HDL foi maior no soro dos adultos, em comparação a de neonatos (P7 e P14), independente do sexo ($P < 0,05$). Entretanto, fêmeas adultas apresentaram concentração maior de HDL em comparação aos machos adultos ($P < 0,05$) [Figura 2].

Em fêmeas houve correlação positiva entre atividade da PON 1 e concentração de HDL sérico apenas nas neonatas de 7 dias [Figura 3]. Nos machos, entretanto, houve correlação positiva entre atividade da PON-1 e HDL sérico em animais adultos e P14, não sendo observada correlação nos animais P7 [Figura 3].

A concentração de CT foi maior no soro de neonatos (P7 e P14) em relação aos animais adultos ($P < 0,05$) [Figura 4]. Não houve diferença significativa na concentração de colesterol sérico entre os sexos em nenhuma das idades estudadas ($P > 0,05$). Quanto às concentrações séricas de TGC, não foi observada diferença significativa entre adultos e filhotes, nem entre sexos em nenhuma das idades estudadas ($P > 0,05$). Entretanto, machos P14 apresentaram aumento de TGC sérico quando comparado aos machos P7 ($P < 0,05$) [Figura 5]. A concentração hepática de triacilgliceróis também não diferiu entre os sexos ou entre as diferentes idades ($P > 0,05$) [Figura 7].

Em relação à glicose plasmática, os machos P14 apresentaram maior concentração em relação aos P7 e adultos ($P < 0,05$). Nas fêmeas não houve mudança significativa na concentração de glicose entre as diferentes idades ($P > 0,05$) [Figura 5].

Para o peso corporal não foi observada diferença significativa entre os sexos conforme as idades estudadas ($P > 0,05$) [Tabela 1]. As fêmeas adultas apresentaram peso úmido do fígado maior do que fêmeas P7 ($P < 0,05$), o mesmo não acontecendo com as fêmeas adultas quando comparadas às P14, e entre os sexos conforme as idades estudadas ($P > 0,05$) [Tabela 1]. O peso úmido do TABr foi maior em adultos quando comparado aos neonatos (P7 e P14) [$P < 0,05$], independente do sexo. Entre adultos, machos apresentaram maior peso do TABr quando comparados a fêmeas ($P < 0,05$) [Tabela 1].

Maiores ILS e o IHS foram encontrados em adultos quando comparadas a neonatos (P7 e P14) [$P < 0,05$], independente do sexo. Além disso, fêmeas P14 apresentaram maior ILS do que fêmeas P7 ($P < 0,05$) [Figura 8A e 8B]. Entre os adultos, foram encontrados maiores valores de ILS (Figura 8A) e menores valores de IHS (Figura 8B) nos machos quando comparados a fêmeas ($P < 0,05$).

Discussão

Durante os últimos 20 anos, vários estudos demonstraram que a atividade da enzima paraoxonase está relacionada ao seu efeito associado ao HDL, prevenindo a oxidação das membranas celulares e do LDL e funcionando como um protetor das artérias contra o desenvolvimento de aterosclerose (Mackness and Mackness, 2015). Contudo, esta enzima é atualmente considerada multifuncional, apresentando funções anti-inflamatória, anti-oxidante, no sistema imune e relacionadas a proteção contra o efeito tóxico de pesticidas (Mackness and Mackness 2015; Furlong et al. 2016; Bai et al. 2018). A redução da atividade da PON1 está associada a distúrbios como diabetes, doenças cardiovasculares, artrite reumatoide, câncer e

infecções agudas. (Furlong et al. 2016; Costa et al. 2005). Estudos que abordem a atividade da paraoxonase e suas funções em modelos biológicos animais são importantes para que seus efeitos possam ser investigados e testados em diferentes condições fisiológicas e etapas do desenvolvimento.

O presente trabalho demonstrou que a atividade arilesterase da enzima PON1 e a concentração plasmática de HDL foram maiores em ratos adultos em relação a neonatos de 7 e 14 dias (Figura 1). Contudo, não houve diferença nestes parâmetros entre os sexos em neonatos. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados em humanos. Gugliucci et al. (2015) avaliaram a atividade lactonase da PON1 em humanos adultos e neonatos a termo e encontraram menor atividade dos recém-nascidos em relação às mães e também não encontraram diferenças entre machos e fêmeas neonatos. Mogarekar and Rojekar (2014) descreveram que existe correlação negativa entre peso ao nascer e atividade arilesterase da PON 1 em humanos, sendo que neonatos nascidos com menor peso apresentaram menor atividade da enzima quando comparados com neonatos de peso normal. Strakowski et al. (2014) demonstraram que a dieta hiperlipídica da mãe durante a gestação aumenta a atividade da enzima PON 1 somente em ratos machos pré-termo e não em fêmeas. O perfil de lipoproteínas dos neonatos humanos também difere dos adultos, sendo que neonatos contém muito pouco VLDL e LDL e menores concentrações de HDL comparado aos adultos (Gugliucci and Menini, 2015).

A PON1 é sintetizada principalmente no fígado e secretada no sangue, onde se associa predominantemente com HDL (Deakin et al. 2002). Uma menor atividade de PON1 nos neonatos, como observado no presente estudo, os torna mais suscetíveis ao estresse oxidativo e à toxicidade de organofosforados. Baixas concentrações de PON1 no soro de humanos e roedores adultos estão associadas a muitas doenças com grande componente inflamatório incluindo *Diabetes mellitus*, Artrite Reumatoide, Lúpus Eritematoso Sistêmico e várias doenças hepáticas e

renais incluindo Insuficiência Renal, Psoríase e Degeneração Macular (Goswami et al. 2009). Contudo, o baixo conteúdo de HDL, à luz do perfil lipoproteico típico dos neonatos, é consistente com o papel da PON1 como um antioxidante.

Na literatura existem poucos trabalhos investigando as diferenças na atividade e função da paraoxonase entre machos e fêmeas. Estudos realizados com camundongos demonstraram que a atividade sérica da PON 1 e sua expressão hepática são maiores nas fêmeas do que nos machos (Wehner et al. 1987; Ali et al. 2002). O presente trabalho demonstra, pela primeira vez, que a atividade plasmática da PON1 também é maior em ratas fêmeas adultas em diestro em relação aos machos, o que é acompanhado pela maior concentração de HDL nas fêmeas (Figuras 1 e 2). Camundongos machos quando gonadectomizados apresentaram expressão da PON1 hepática semelhante à das fêmeas. As variações na concentração de PON1 entre machos e fêmeas adultos não foram associadas com a concentração de testosterona circulante (Ali et al. 2002).

Contudo, a concentração de HDL plasmática se correlacionou positivamente com a atividade da PON 1 apenas nos machos adultos e não nas fêmeas. Polimorfismo da PON 1 já foi evidenciado em humanos e roedores (Mackness and Mackness 2015). Nossos resultados sugerem que possa haver diferenças polimórficas na enzima PON1 entre ratos machos e fêmeas, o que poderia explicar a diferença na correlação entre os sexos. Contudo, esta hipótese ainda não foi investigada. Além destes fatores, machos e fêmeas adultos tem diferentes concentrações plasmáticas de hormônios esteróides e não se pode descartar a hipótese de que esta maior atividade da PON 1 em fêmeas adultas esteja relacionada com a presença dos hormônios gonadais estrogênio e progesterona.

Diversos estudos investigaram a associação entre a enzima PON1 e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Resultados com animais vem claramente demonstrado o benefício protetivo da PON1 em relação à formação da placa aterosclerótica (Khalil et al. 2017). Uma das

principais funções fisiológicas parece ser a ação sobre lipoproteínas oxidadas que tem efeito deletérios sobre as membranas celulares (Mackness et al. 1991). A maior expressão da PON1 nas fêmeas de ratos (Figura 1) corrobora com o fato das fêmeas apresentarem maior proteção a lesões endoteliais e desenvolvimento de aterosclerose do que os machos (Melo et al. 2018; Holland et al, 2006).

Os ratos machos adultos apresentaram maiores valores de ILS e menores valores de IHS em relação às fêmeas, sendo que nas fêmeas, o ILS mostrou-se maior em relação aos neonatos (entre P7 e P14) (Figura 8). Além disso, as concentrações de glicose plasmática foram maiores em machos de 14 dias em relação aos machos de 7 dias, o mesmo não acontecendo para as fêmeas (Figura 5). Não foi observada correlação entre atividade da PON1 e índices somáticos ou glicemia. Nós encontramos uma correlação positiva entre peso corporal e atividade da PON1, sendo que animais de maior peso apresentaram maior correlação com a atividade da enzima.

Estudos recentes sugerem a associação das dislipidemias com a atividade da PON1 plasmática, sendo que quanto menor a atividade da PON1, maior o nível de TGC e LDL e menores as taxas de HDL séricos (Cheraghi et al. 2017; Fridman et al. 2016). Em humanos, o perfil de lipoproteínas dos neonatos contém muito pouco VLDL e LDL (Gugliucci et al. 2017; Gugliucci and Menini, 2015) quando comparado ao dos adultos, além de apresentarem menores valores de colesterol total (Stozický et al. 1982). Em ratos, Wang et al (2009) encontraram valores maiores de CT em ratos de 7 dias comparado aos adultos. Nossos resultados corroboram com esses resultados da literatura, pois neonatos P7 e P14 apresentaram maior concentração de CT quando comparados aos animais adultos, independente do sexo (Figura 4). Além disso, machos adultos e de 14 dias apresentaram maiores valores de TGC comparado aos machos de 7 dias. As fêmeas não apresentaram variação nas concentrações de TGC nas diferentes idades (Figura 6). Esses resultados evidenciam que o perfil lipídico dos neonatos, especialmente animais

P7 difere entre machos e fêmeas. A porcentagem de TGC hepáticos não diferiu nas diferentes idades (Figura 7). Contudo, considerando que adultos tem maior peso úmido do fígado e maior índice hepatossomático (Tabelas 1 e 2), podemos inferir que a quantidade total de TGC armazenada no fígado pelos adultos é maior do que em neonatos.

Neste trabalho demonstramos que houve diferença no perfil lipídico plasmático e na atividade da PON1 entre machos e fêmeas adultos e entre adultos e filhotes. Além disso, a atividade da PON se correlacionou positivamente com HDL em machos e fêmeas de forma diferente. Esses resultados evidenciam a necessidade crescente de investigações com modelos animais que avaliem as diferenças entre os gêneros e idade quanto às funções desta enzima para a prevenção de patologias relacionadas a estresse oxidativo, como aterosclerose e doenças inflamatórias. A maior atividade da enzima associada a elevados valores de HDL em fêmeas pode estar relacionada a um perfil protetor para doenças inflamatórias.

Referências

AHARONI, S.; AVIRAM, M.; FUHRMAN, B. Paraoxonase 1 (PON1) reduces macrophage inflammatory responses. **Atherosclerosis**, [s.l.], v. 228, n. 2, p.353-361, jun. 2013. Disponível em: <[https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150\(13\)00180-9/fulltext](https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150(13)00180-9/fulltext)>. Acesso em: 22 nov. 2018.

ALI, A. B. et al. Expression of major HDL-associated antioxidant PON-1 is gender dependent and regulated during inflammation. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 34, n. 7, p.824-829, abr. 2003. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/10841411_Expression_of_major_HDL_associated_antioxidant_PON1_is_gender_dependent_and_regulated_during_inflammation>. Acesso em: 12 set. 2018.

ALTUNHAN, H. et al. Total oxidant, antioxidant, and paraoxonase levels in babies born to pre-eclamptic mothers. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, Tokyo, v. 39, n. 5, p. 898-904, May 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jog.12026/epdf>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

BAI, L. et al. Paraoxonase 1 knockout rats have impaired T cell development at the CD4/CD8 double-negative to double-positive transition stage. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-9, 27

set. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-018-32780-w>>. Acesso em: 01 out. 2018.

BIJUMON, P.; ANANTHASHENOYI, G.; IYPE, T. Oxidised LDL and Serum Paraoxanase Activity in Ischemic Stroke Patients: A Case Control Study. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**, [s.l.], p.12-15, 2018. Disponível em: <[https://www.jcdr.net/articles/PDF/11910/36402_CE\[Ra\]_F\(Sh\)_PF1\(SH_OM\)_PN\(AP\).pdf](https://www.jcdr.net/articles/PDF/11910/36402_CE[Ra]_F(Sh)_PF1(SH_OM)_PN(AP).pdf)>. Acesso em: 10 nov. 2018.

BROWN, E. T. et al. Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice. **Visual Neuroscience**, Cambridge, v. 22, n. 05, p. 615-618, Sept. 2005. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/50457982E5846EDE629D2E665A57C2C2/S0952523805225105a.pdf/anesthesia_can_cause_sustained_hyperglycemia_in_c57bl6j_mice.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2017.

BROWNE, R. W. et al. Accuracy and Biological Variation of Human Serum Paraoxonase 1 Activity and Polymorphism (Q192R) by Kinetic Enzyme Assay. **Clinical Chemistry**, [s.l.], v. 53, n. 2, p.310-317, 7 dez. 2006. Disponível em: <<http://clinchem.aaccjnls.org/content/53/2/310>>. Acesso em: 03 maio 2018.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. Organização de dados quantitativos. In: CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003. cap. 2, p. 20-32.

CHERAGHI, M. et al. Paraoxonase 1 Activity, Lipid Profile, and Atherogenic Indexes Status in Coronary Heart Disease. **Biochemistry & Molecular Biology**. [s.l.], v. 1, n. 6, p. 1-7, Oct. 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Hassan_Ahmadvand/publication/313037189_Paraoxonase_1_Activity_Lipid_Profile_and_Atherogenic_Indexes_Status_in_Coronary_Heart_Disease/links/588e1b6792851cef1362c8b1/Paraoxonase-1-Activity-Lipid-Profile-and-Atherogenic-Indexes-Status-in-Coronary-Heart-Disease.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2017.

DEAKIN, S. et al. Enzymatically Active Paraoxonase-1 Is Located at the External Membrane of Producing Cells and Released by a High Affinity, Saturable, Desorption Mechanism. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 277, n. 6, p.4301-4308, 28 nov. 2001. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11726658>>. Acesso em: 23 out. 2018.

DEAKIN, S. P. et al. HDL-associated paraoxonase-1 can redistribute to cell membranes and influence sensitivity to oxidative stress. **Free Radical Biology And Medicine**, New York, v. 50, n. 1, p.102-109, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez45.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0891584910005344?via=ihub>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

DUNCAN, B. B. et al. Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 46, supl., p. 126-134,

nov. 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v46s1/17.pdf>>. Acesso em: 21 nov. 2017.

DURRINGTON, P. N.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M. I. Paraoxonase and Atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, [s.l.], v. 21, n. 4, p.473-480, abr. 2001. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/12030839_Paraoxonase_and_Atherosclerosis>. Acesso em: 10 set. 2018.

FRIDMAN, O. et al. Paraoxonase 1 gene polymorphisms and enzyme activities in coronary artery disease and its relationship to serum lipids and glycemia. **Archivos de Cardiología de México**, México, v. 86, n. 4, p. 350-357, Oct./Dec. 2016. Disponível em: <<http://www.elsevier.es/es-revista-archivos-cardiologia-mexico-293-linkresolver-paraoxonase-1-gene-polymorphisms-enzyme-S1405994016300751>>. Acesso em: 30 out. 2017.

FURLONG, Clement E. et al. Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their functions?. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 259, p.51-62, nov. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279716302150?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 out. 2018.

KHALIL, A. et al. The role of paraoxonase 1 in regulating high-density lipoprotein functionality during aging. **Canadian Journal Of Physiology And Pharmacology**, [s.l.], v. 95, n. 10, p.1254-1262, out. 2017. Disponível em: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/cjpp-2017-0117#.W_r2jmhKgdU>. Acesso em: 15 out. 2018.

GOSWAMI, B. et al. Paraoxonase: A multifaceted biomolecule. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 410, n. 1-2, p.1-12, dez. 2009. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S0009898109004926/1-s2.0-S0009898109004926-main.pdf?_tid=4cea15d4-ea56-11e7-9a7e-00000aabb0f6c&acdnat=1514304384_5865ee3aa5fb09ff90daaed7a159fe3c>. Acesso em: 25 dez. 2017.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. Paraoxonase 1 and HDL maturation. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 439, p. 5-13, Jan. 2015. Disponível em: <<http://wp.ufpel.edu.br/renataabib/files/2017/08/Gugliucci2015.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

GUGLIUCCI, A. et al. Paraoxonase 1 lactonase activity and distribution in the HDL subclasses in the cord blood. **Redox Report**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.124-132, 13 jan. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1179/1351000213y.0000000081>. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/1351000213Y.0000000081>>. Acesso em: 26 set. 2017.

HOLLAND, Nina et al. Paraoxonase Polymorphisms, Haplotypes, and Enzyme Activity in Latino Mothers and Newborns. **Environmental Health Perspectives**, [s.l.], v. 114, n. 7, p.985-991, jul. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1513322/>>. Acesso em: 12 set. 2018.

KIM, N. S. et al. Decreased paraoxonase-1 activity is a risk factor for ischemic stroke in Koreans. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 364, n. 1, p.157-162, dez. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17936248>>. Acesso em: 24 nov. 2018.

MACKNESS, M. I.; ARROL, S.; DURRINGTON, P. N. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. **Febs Letters**, [s.l.], v. 286, n. 1-2, p.152-154, 29 jul. 1991. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80962-3](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(91)80962-3). Disponível em: <<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1016/0014-5793%2891%2980962-3>>. Acesso em: 26 out. 2017.

MACKNESS, M.; MACKNESS, B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. **Gene**, Amsterdam, v. 567, n. 1, p.12-21, Aug. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4458450/>>. Acesso em: 29 nov. 2017.

MELO, J. B. de et al. Cardiovascular Risk Factors in Climacteric Women with Coronary Artery Disease. **International Journal Of Cardiovascular Sciences**, [s.l.], p.4-11, 2017. Acesso em: 27 out. 2018.

REPÁRAZ, F. et al. Perfil lipídico: evolución, tendencia y seguimiento desde la infancia a la edad adulta. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**. Navarra, v. 21, n. 2, p. 155-165, Mayo/Agosto 1998. Disponível em: <<https://recyt.fecyt.es/index.php/ASSN/article/view/7384/9134>>. Acesso em: 10 out. 2017.

MOGAREKAR, M. R.; ROJEKAR, M. V.. Correlation of Paraoxonase1 Activities with Birth Weight. **The Indian Journal Of Pediatrics**, [s.l.], v. 81, n. 8, p.760-761, 19 set. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24048877>>. Acesso em: 24 out. 2018.

ROCHA, D. S. et al. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on the metabolism of diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 105, p.370-376, set. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0753332218302087?via%3Dihub>>. Acesso em: 07 fev. 2018.

SAHA, J. K. et al. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. **Experimental Biology and Medicine**. v. 230, n. 10, p. 777-784, Nov. 2005.

SANTOS, B. F. Criação e Manejo de Ratos. In: ANDRADE, A. et al. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. p. 119-121. Disponível em: <<https://static.scielo.org/scielobooks/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869.pdf>>. Acesso em: 01 dez. 2017.

SANTOS, M. C. B. dos et al. Hábitos e perfil socioeconômico do paciente aterosclerótico no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, Brasília, v. 3, n. 22, p. 247-256, jun. 2011. Disponível em:

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/revista_ESCS_v22_n3_a07_habitos_perfil_socioeconomico.pdf>. Acesso em: 28 out. 2017.

STOZICKÝ, F; SLABÝ, P; VOLENIKOVÁ, L. The pattern of major serum apolipoproteins during the early neonatal period. **Acta Paediatrica Scandinavica**, Stockholm, v. 2, n. 71, p.154-160, mar. 1982.

STRAKOVSKY, R. S. et al. The regulation of hepatic Pon1 by a maternal high-fat diet is gender specific and may occur through promoter histone modifications in neonatal rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 25, n. 2, p. 170-176, Feb. 2014. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S095528631300226X/1s2.0-S095528631300226Xmain.pdf?_tid=5d5e5016eb0911e7bc5b00000aab0f02&acdnat=1514381291_95bc3d3836d9f84023a6f5a87ec28822>. Acesso em: 10 nov. 2017.

VLACHOS, G. D. et al. Maternal–neonatal serum paraoxonase 1 activity in relation to the mode of delivery. **Clinical Biochemistry**, New York, v. 39, n. 9, p. 923-928, Sept. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912006001536?via=ihub>>. Acesso em: 12 out. 2017.

WANG, Y. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Agonists Enhance Lung Maturation in a Neonatal Rat Model. **Pediatric Research**, [s.l.], v. 65, n. 2, p.150-155, fev. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2921215/>>. Acesso em: 13 out. 2018.

WEHNER, J. M. et al. Genetic variation in paraoxonase activity and sensitivity to diisopropylphosphofluoridate in inbred mice. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.317-320, out. 1987. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0091305787902310?via%3Dihub>>. Acesso em: 16 ago. 2018.

Tabela 1. Peso corporal e pesos teciduais de fêmeas e machos em diferentes idades

	Peso Corporal Total (g)	Peso úmido do Fígado (g)	Peso úmido TAB (g)
P7F	17,54 (15,51-26,76) ^a	0,51 (0,46-0,65) ^a	0,03 (0,02-0,06) ^a
P7M	20,19 (11,17-23,99) ^b	0,51 (0,34-0,56) ^b	0,04 (0,02-0,07) ^b
P14F	27,79 (20,85-29,40) ^a	0,72 (0,60-0,77) ^a	0,10 (0,04-0,11) ^a
P14M	33,54 (20,96-34,30) ^b	0,95 (0,58-0,97) ^b	0,07 (0,05-0,09) ^b
Adulto F	226,5 (210,0-240,3)	8,40 (7,97-9,04)	1,70 (1,5-1,9)*
Adulto M	385,5 (372,0-404,0)	13,54 (12,56-14,47)	4,08 (3,4-4,3)*

Os dados estão representados como mediana (intervalo interquartil). $n = 9$ a 12 . * $p < 0,05$ diferença significativa entre fêmeas e machos; ^a $p < 0,05$ diferença significativa em relação às fêmeas adultas; ^b $p < 0,05$ diferença significativa em relação aos machos adultos; F=fêmea, M=macho; P7=animais de 7 dias de idade; P14=animais de 14 dias.

Figura 1. Atividade da enzima Paraoxonase 1 (PON-1) em soro de fêmeas e machos em diferentes idades. $n=9$ a 12. Os dados são representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ diferença significativa entre fêmeas e machos; ^a $p < 0,05$ diferença significativa em relação às fêmeas adultas; ^b $p < 0,05$ diferença significativa em relação aos machos adultos; ^c $p < 0,05$ diferença significativa entre fêmeas P7 e P14. P7=neonatos de 7 dias de idade; P14=neonatos de 14 dias de idade.

Figura 2. Concentração de colesterol HDL no soro de fêmeas e machos em diferentes idades. $n=9$ a 12. Os dados são representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ diferença significativa entre fêmeas e machos; ^a $p < 0,05$ diferença significativa em relação às fêmeas adultas; ^b $p < 0,05$ diferença significativa em relação aos machos adultos. P7=neonatos de 7 dias de idade; P14=neonatos de 14 dias de idade.

Figura 3. Correlação de *Pearson* entre PON-1 e HDL em fêmeas P7 (A), P14 (B) e adultas (C) e machos P7 (D), P14 (E) e adultos (F). * $p < 0,05$ correlação entre PON1 e HDL. Os valores de r e p estão indicados na figura. P7=neonatos de 7 dias de idade; P14=neonatos de 14 dias de idade.

Figura 4. Concentração de colesterol total no soro de fêmeas e machos em diferentes idades. $n=10$ a 12. Os dados são representados como mediana (intervalo interquartil) ^a $p < 0,05$ diferença significativa em relação às fêmeas adultas; ^b $p < 0,05$ diferença significativa em relação aos machos adultos; P7=neonatos de 7 dias de idade; P14=neonatos de 14 dias de idade.

Figura 5. Concentração de glicose no soro de fêmeas e machos em diferentes idades. $n=9$ a 12. Os dados são representados como média \pm EPM. ^b $p < 0,05$ diferença significativa em relação

aos machos adultos. ^d p <0,05 diferença significativa entre machos P7 e P14. P7=neonatos de 7 dias de idade; P14=neonatos de 14 dias de idade.

Figura 6. Concentração de triacilgliceróis no soro de fêmeas e machos em diferentes idades. *n*=8 a 12. Os dados são representados como mediana (intervalo interquartil). ^dp <0,05 diferença significativa entre machos P7 e P14. P7=neonatos de 7 dias de idade; P14= neonatos de 14 dias de idade.

Figura 7. Concentração de triacilgliceróis no fígado de fêmeas e machos em diferentes idades. *n*=9 a 13. Os dados são representados como média ± EPM. P7=neonatos de 7 dias de idade; P14=neonatos de 14 dias de idade.

Figura 8. Variação dos Índices corporais entre fêmeas e machos em diferentes idades. Índice Lipossomático (A) *n*=10 a 13 e Índice Hepatossomático (B) *n*=9 a 12. Os índices representam a porcentagem de peso úmido do tecido em relação ao peso corporal total. *p <0,05 diferença significativa entre fêmeas e machos; ^ap <0,05 diferença significativa em relação às fêmeas adultas; ^b p <0,05 diferença significativa em relação aos machos adultos; ^c p <0,05 diferença significativa entre fêmeas P7 e P14. P7=neonatos de 7 dias de idade; P14=neonatos de 14 dias de idade.

Figura 1

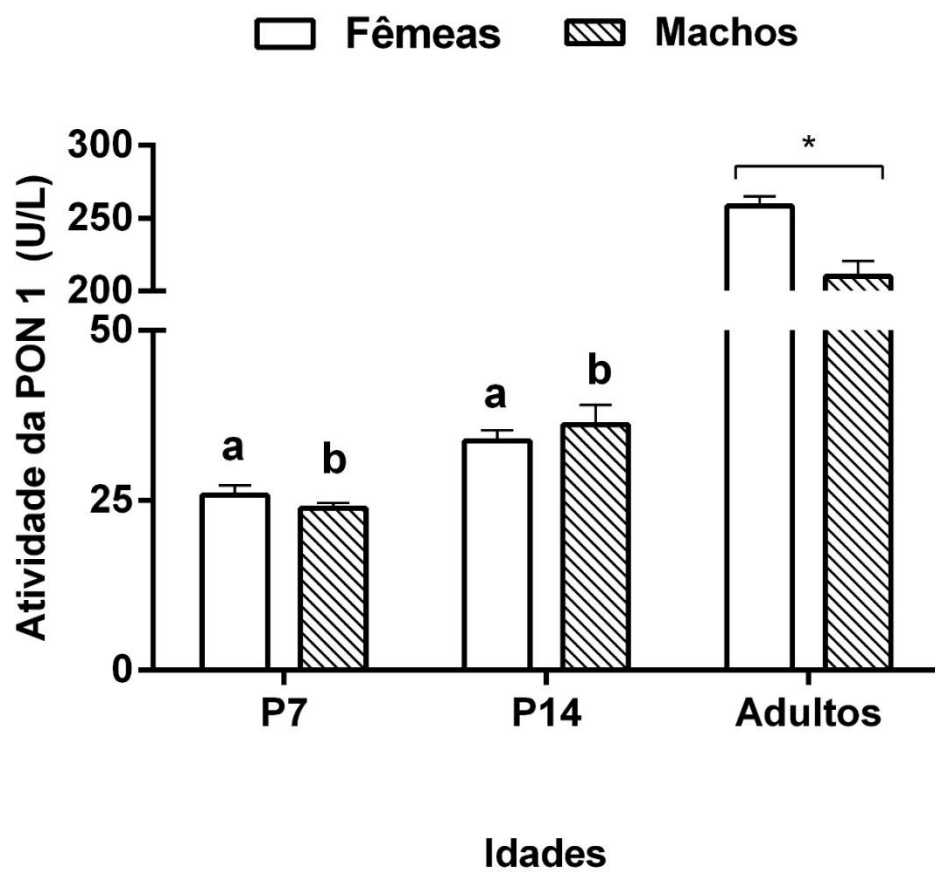


Figura 2

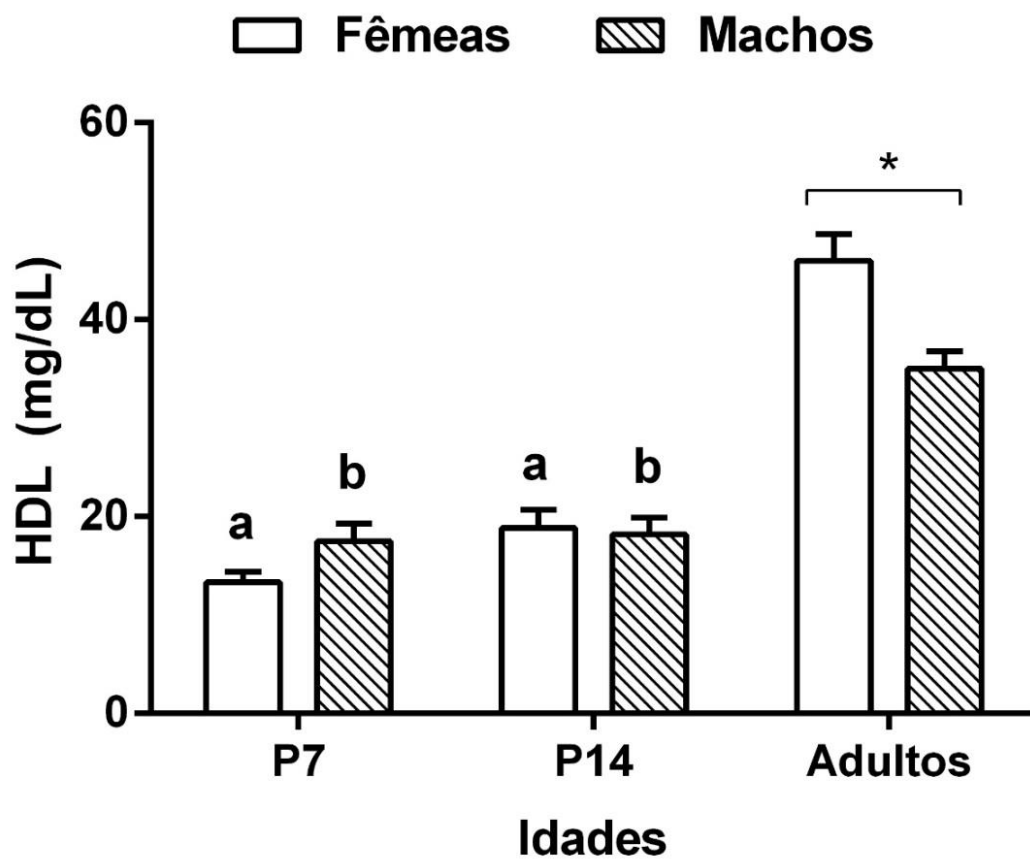


Figura 3

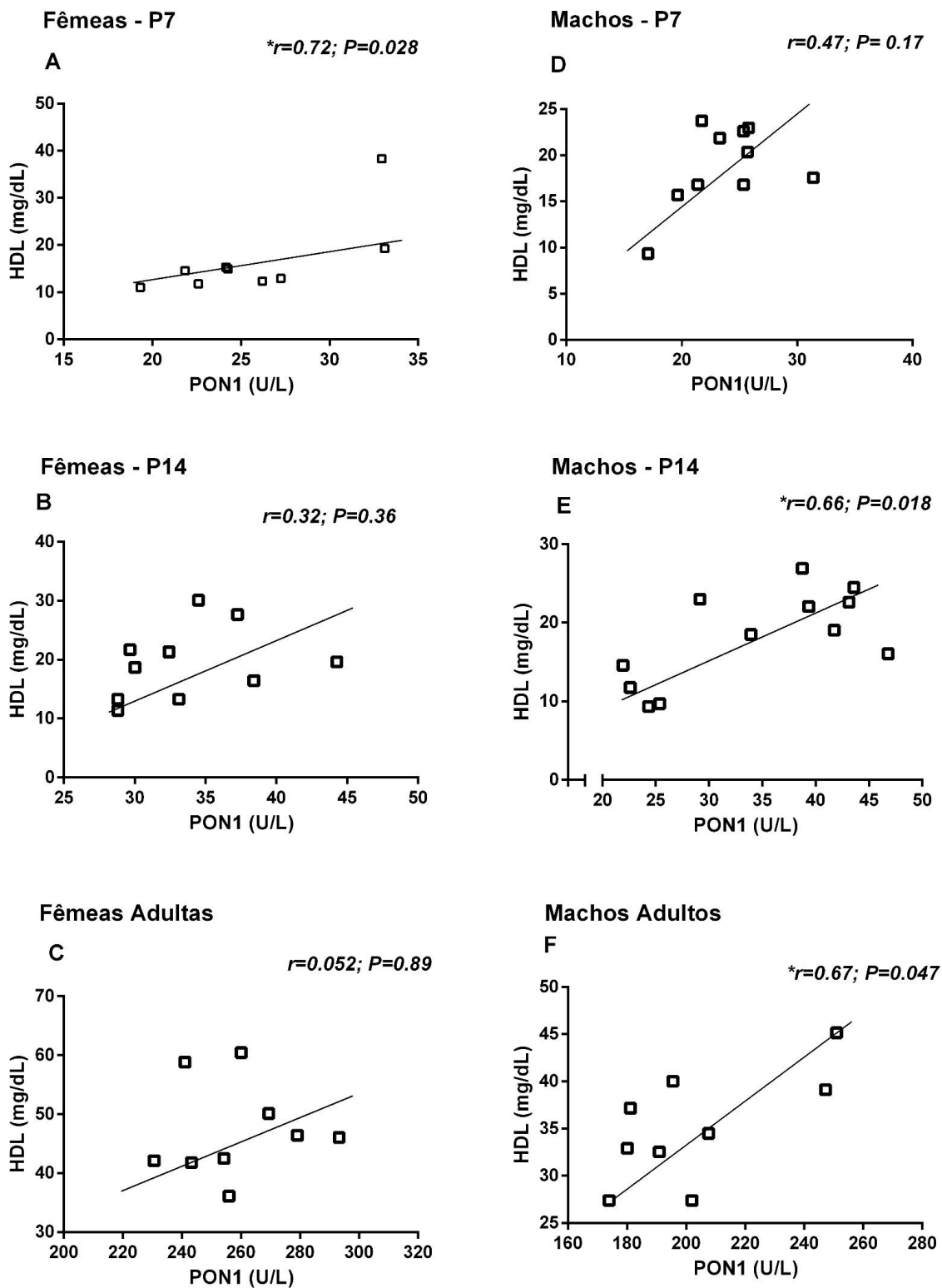


Figura 4



Figura 5

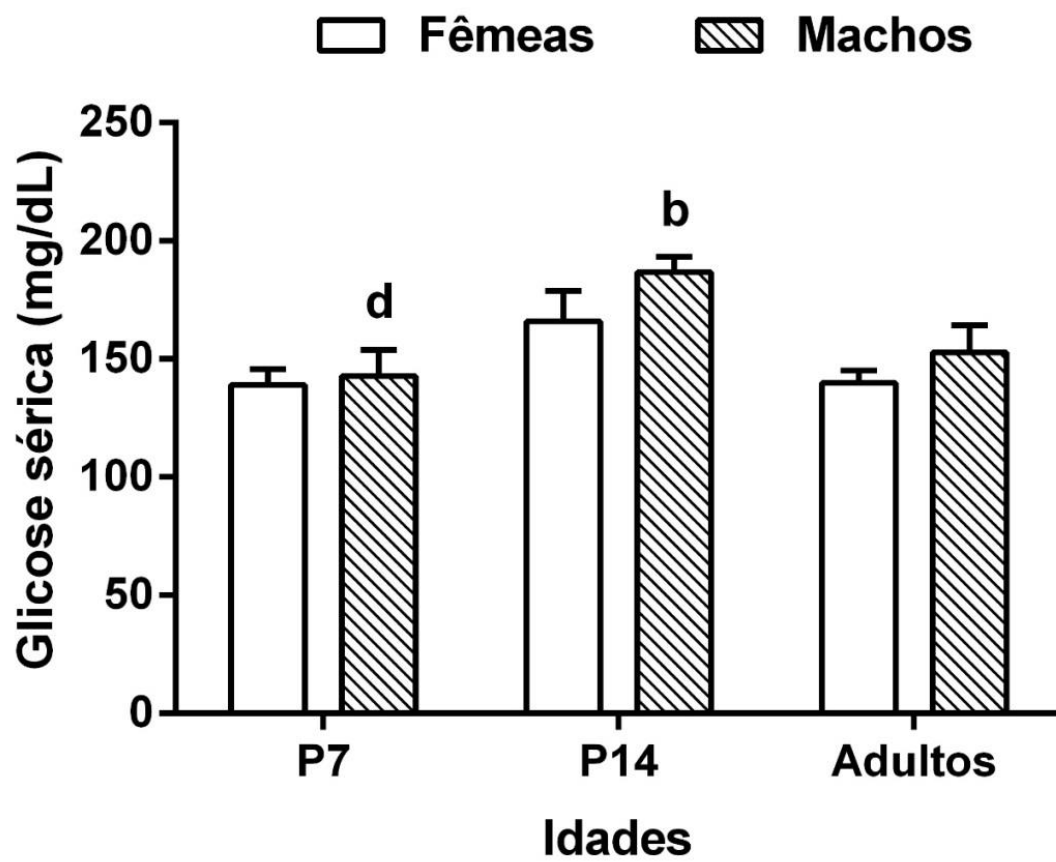


Figura 6

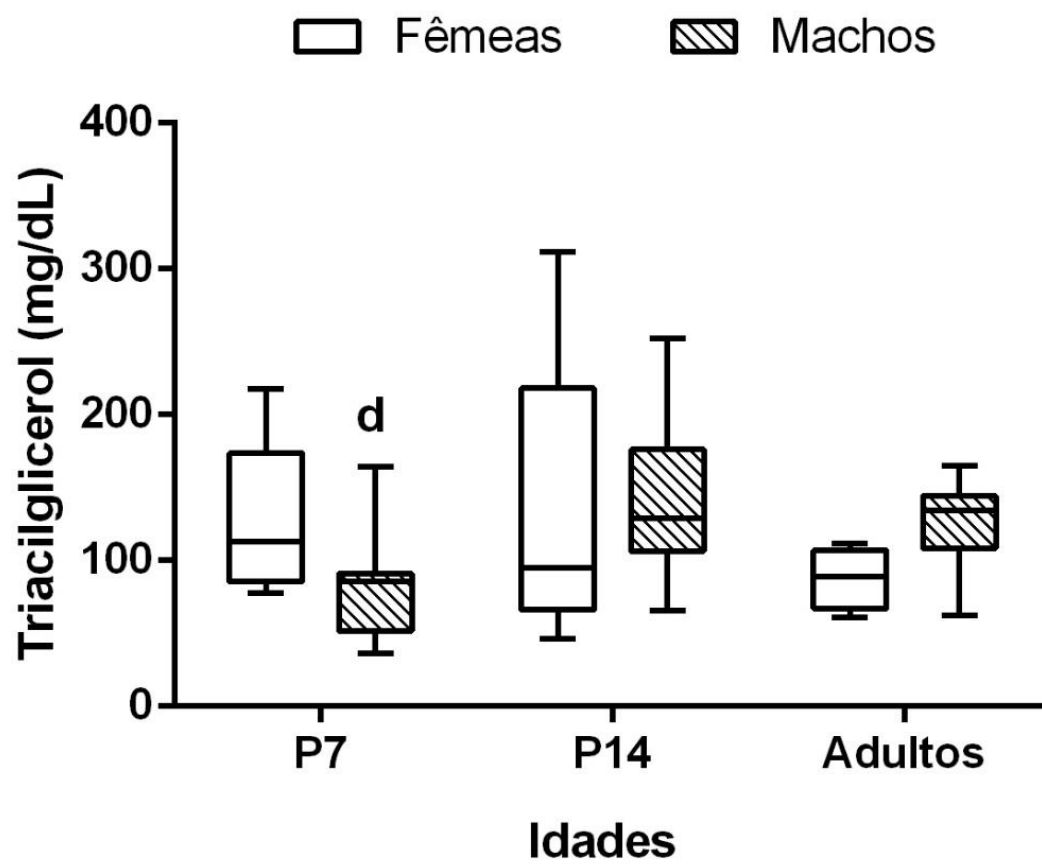


Figura 7

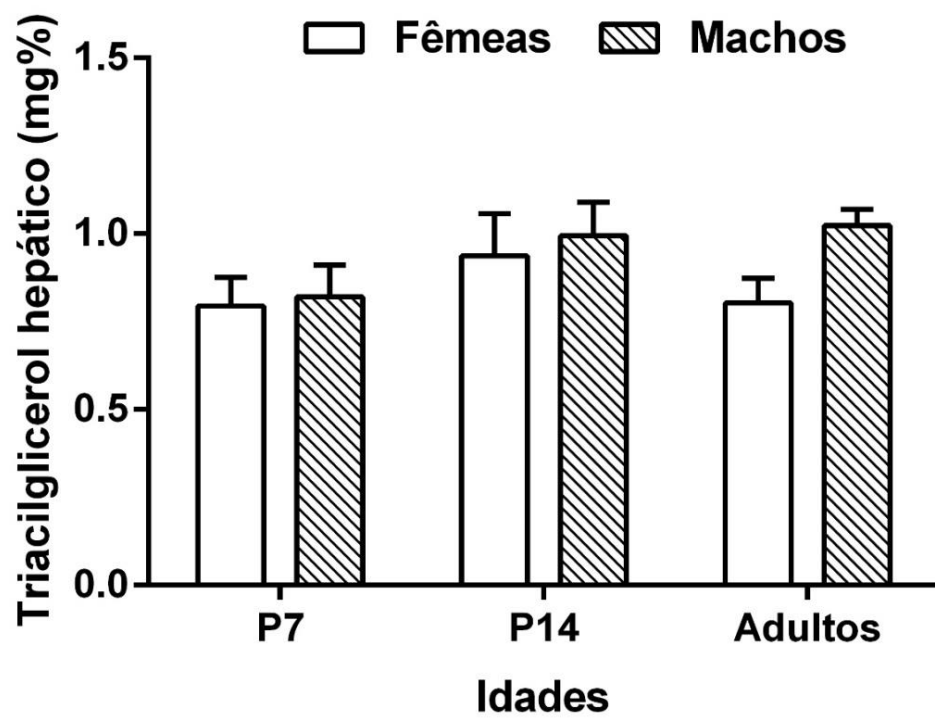
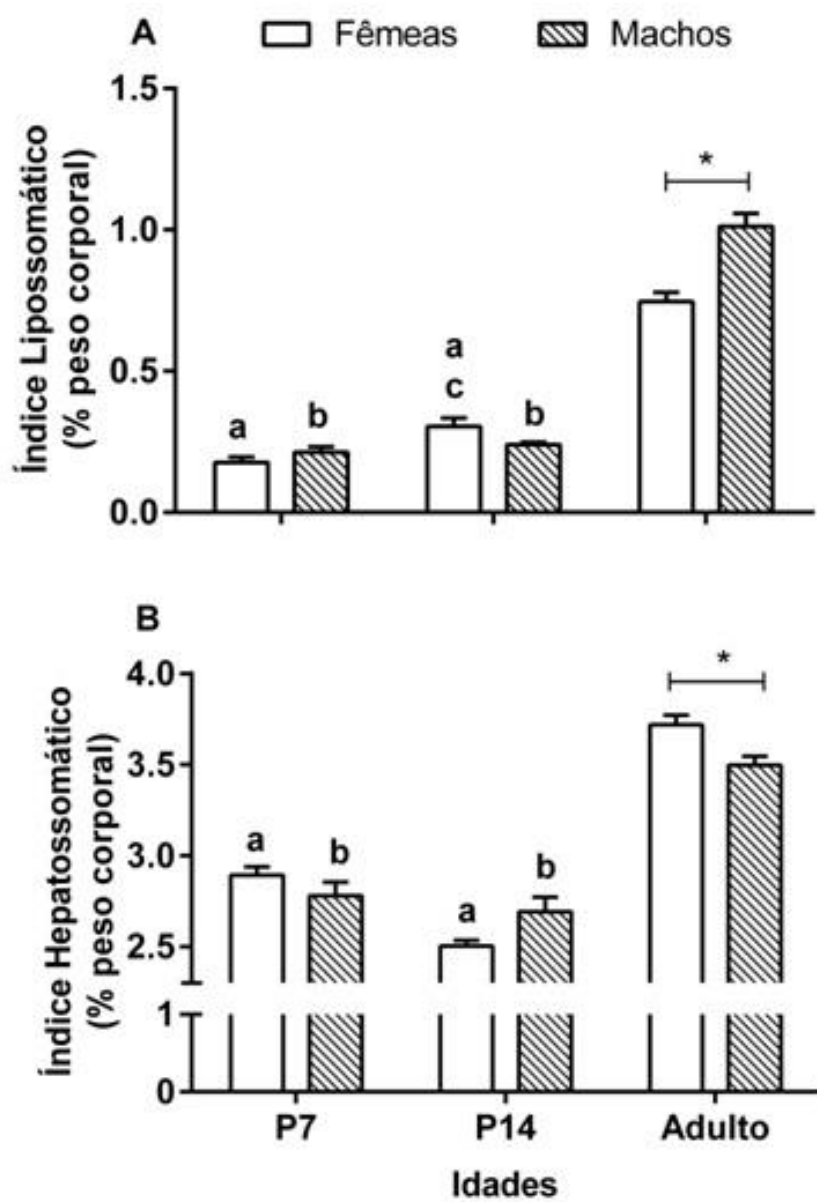


Figura 8



ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE PESQUISA DO INSTUTO DE CIENCIAS BÁSICAS (COMPESQ-ICBS)

Email - hotmail.com X Canadian Journal of Physiology X Sistema Pesquisa - Pesquisador X +

https://www1.ufrgs.br/PortalServidor/Pesquisa/Pesquisador/forms/form_index.php

Sistema Pesquisa - Documentar - Márcia Trapp

UFRGS
 Linhas de Pesquisa
 Projetos de Pesquisa
 Áreas de Atuação
 Bolsas de Pesquisa
 Iniciação Científica/Tecnológica
 Voluntário
 Programa de Fomento à Pesquisa (auxílio)
 Pós-doutorado
 Docente ou Técnico-Administrativo Convocado

Dados Gerais:

Projeto: O projeto "34595 - Estudo da atividade da PON-1 e perfil lipídico plasmático e hepático em ratos *Rattus norvegicus* neonatos e adultos, machos e fêmeas", coordenado pela Prof. Dra. Márcia Trapp, vinculada ao Departamento de Fisiologia do ICBS e submetido à apreciação da Comissão de Pesquisa deste Instituto, trata-se de projeto de pesquisa original e apresenta mérito científico. O objetivo principal consiste em avaliar a associação entre a atividade plasmática e hepática da enzima paraoxonase-1 (PON1) e o perfil lipídico plasmático em ratos de ambos os sexos e de diferentes idades. O projeto está bem fundamentado e apresenta metodologia adequada para que os objetivos sejam alcançados. O cronograma prevê um período de 10 meses para a execução do projeto. O cálculo do número amostral e a análise estatística estão detalhados. Há previsão de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Também há adequação à resolução 03/2000 da Câmara de Pesquisa (CAMPESQ) sobre o manuseio de reagentes e descarte de materiais. Dessa forma, após o pesquisador responsável ter realizado as alterações solicitadas em diligência, a COMPESQ-ICBS é favorável à APROVAÇÃO do presente projeto. Atenciosamente, COMPESQ-ICBS.

Fechar

Área de Atuação:

Situação:

Origem:

Local de Realização:

Não aprovado:

Objetivo:

Palavras Chaves:

Fechar

ANEXO II – CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA E USO DE ANIMAIS (CEUA)



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 34595

Título: ESTUDO DA ATIVIDADE DA PARAOXONASE-1 E PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO E HEPÁTICO EM RATOS *Rattus norvegicus* NEONATOS E ADULTOS, MACHOS E FÊMEAS

Vigência: 02/04/2018 à 15/12/2018

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MARCIA TRAPP - coordenador desde 02/04/2018

MARCIA KOJA BREIGEIRON - pesquisador desde 02/04/2018

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 04/06/2018 - Sala 323 do anexo I do Prédio da Reitoria - Campus Centro - Av. Paulo Gama, 100- Porto Alegre- RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 68 ratos Wistar sendo 24 ratos neonatos com 07 dias de vida(12 fêmeas e 12 machos); 24 ratos neonatos, com 14 dias de vida (12 fêmeas e 12 machos); 20 ratos adultos com 90 dias de vida (10 fêmeas e 10 machos) e 6 ratas-mães, com ninhadas de 8 filhotes cada (4 machos e 4 fêmeas), provenientes do CREAL/UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 15 de Junho de 2018

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética

ANEXO III – REGRAS DA REVISTA

The *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* (Can. J. Physiol. Pharmacol.) is an international journal and publishes, in English or French, peer-reviewed reports of original research on all aspects of physiology, pharmacology, nutrition, and toxicology, including the fields of cardiovascular science; drug disposition and biochemical toxicology; endocrinology; gastroenterology; musculoskeletal sciences, including cellular motility; neuroscience (i.e., autonomic, cellular, central); renal and respiratory sciences; thermal physiology; and nutritional sciences, including the interaction of nutrition with the above.

Although the Scope of the Journal is broad, the *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* does not accept papers addressing the actions of plant or other biological extracts which may contain several active molecules with potentially distinct mechanisms of action.

There are **no page charges** for publication in the Journal.

Types of papers

An **article** reports a completed definitive study of original research that has not been previously published.

A **brief report** describes well-documented results of original research that is of smaller scope than an article. Brief reports may not be used for preliminary publication or as a progress report. Brief reports may contain no more than 12–14 typed, double-spaced manuscript pages consisting of a title, abstract (maximum of 150 words), text, references, figures, and tables. The page count includes the abstract, table and figure legends, a maximum of 20 references, and up to four figures and (or) tables.

A **rapid communication** is intended for the rapid publication of initial findings or full investigations of findings of a particularly novel and significant nature. It should be accompanied by a letter in which the author gives reasons to justify publication of the manuscript as a rapid communication. Rapid communications should be no more than 8–10 typed, double-spaced manuscript pages inclusive of the abstract (maximum of 150 words), text, a maximum of 12 references, table and figure legends, and up to two figures and (or) tables. Authors must suggest three to four reviewers, who may or may not be selected by the Editorial Board. A rapid communication will be either accepted without revision or rejected. However, this rejection will not preclude the subsequent submission of the manuscript in expanded form as a full article.

Reviews must deal with topics of general interest or current importance and should be synthetic rather than comprehensive in emphasis. Reviews are received by invitation only and all invited contributions are subject to normal reviewing processes.

Contact information

The contact information for the Journal is as follows:

Editorial Office

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology
NRC Research Press
65 Auriga Drive, Suite 203
Ottawa, ON K2E 7W6
Canada
Fax: 613-656-9838
E-mail: cjpp@nrcresearchpress.com

Ethics

The ethical standards expected of authors, referees, and editors are described in the NRC Research Press Publication Policy (available on the Journal Web site at <http://nrcresearchpress.com/page/about/policies/pub> or upon request).

Duplicate and prior publication

The Editorial Board considers a paper not eligible for publication if most of the content of the paper (i) is under consideration for publication or is published in a journal, or book chapter; (ii) is under consideration for publication or is published in a conference proceedings or a government publication with a substantial circulation (distributed to 100 or more individuals over a wide area). Authors may post a copy of their submitted (pre-print) or accepted (post-print) manuscript on their own Web site, an institutional repository, a pre-print server, or their funding body's designated archive. We encourage authors to insert hyperlinks from preprints and post-prints to the final published version on the NRC Research Press Web site (www.nrcresearchpress.com). Abstracts or extended abstracts related to conferences do not constitute prior publication. Extended abstracts are usually under 2000 words and do not include presentation of detailed tables and graphics of the results of the study.

Plagiarism

Plagiarism (publishing a substantial portion of one's own previously published research results without acknowledgement of such republication or using work published by another author without attribution) is a serious offence. Because NRC Research Press is committed to combating plagiarism, it participates in CrossCheck. CrossCheck is a multi-publisher initiative to screen content for originality using the software iThenticate, which compares submitted manuscripts against the CrossCheck database of scholarly literature and detects instances of overlapping and similar text. To find out more about CrossCheck visit <http://www.crossref.org/crosscheck.html>.

Conflict of interest and disclosure

The Editor recognizes that authors and peer reviewers may have real or perceived conflicts of interest arising from intellectual, personal, or financial circumstances of their research. Submitted manuscripts should include full disclosure of funding sources for the research and the letter of transmission should include an explanation of any real or perceived conflicts of interest that may arise during the peer review process. Failure to disclose such conflicts may lead to refusal of a submitted manuscript.

Assurance of authorship

The corresponding author must affirm that all of the authors have read and approved the manuscript.

Photographs of people

If a person pictured in a photograph is identifiable, his or her permission is required to publish the photograph. The person will be asked to sign a form (available on the Journal Web site at <http://nrcresearchpress.com/page/authors/information/permissions>) allowing NRC Research Press to publish the photograph.

Photographic manipulation

Authors should be aware that the Journal considers digital images to be data. Hence, digital images submitted should contain the same data as the original image captured. Any manipulation using graphical software should be identified in the methods, including both the name of the software and the techniques used to enhance or change the graphic in any way. Such a disclaimer ensures that the methods are repeatable and ensures the scientific integrity of the work. The removal of artifacts or any (nonintegral) data held in the image is discouraged.

Manuscript guidelines

NRC Research Press maintains the right to preserve the technical quality of the Journal. Delays in publication can be avoided by adherence to the instructions below. Incomplete adherence to the criteria outlined below may result in return of the manuscript for correction before evaluation. The Journal maintains the right to involuntarily withdraw a manuscript if there is no activity and no response to communication for six months. Authors are responsible for updating the Editorial Office of changes in contact information.

Correspondence policy

Authors, Institutional Directors, and Editorial Managers should note that it is the strict policy of the Journal to correspond only with the authors through the designated corresponding author of a paper. The Editor regards a submitted manuscript as a confidential document and seeks to ensure that the authors retain control of the reports obtained during the evaluation process.

Language

Papers must be clearly and concisely written in good English or French. Authors whose native language is not English or French should consult someone fluent in English or French prior to submission of the manuscript. Alternatively, a professional language-editing service can be used. NRC Research Press recommends Editage, a leading provider of English-language editing and author support services. NRC Research Press authors get a special 15% discount on submissions made through this [link](#).

Using Editage to improve your manuscript prior to submission will facilitate the peer review process, making it easier for peer reviewers to assess the science of your manuscript and reducing the risk that it will be rejected because of a lack of clarity. Please note that language editing does not guarantee that your manuscript will be sent out for peer review or accepted for publication.

Abstracts should be submitted in the language of the paper. They will be translated into the other official language by the Journal translator.

Style guide

As a general guide for biological terms, *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers* (8th ed., 2014; <http://www.scientificstyleandformat.org/Home.html>), published by the Council of Science Editors, is recommended.

Fonts

Use an italic font for material that is to be set in italics. Manuscripts that do not conform to this format may be returned to the author for correction before review.

Units of measurement

SI units (Système international d'unités) should be used or SI equivalents should be given. This system is explained and other useful information is given in the *Metric Practice Guide* (2000), CAN/CSA-Z234.1-00, published by the Canadian Standards Association (5060, Spectrum Way, Mississauga, ON M9W 1R3, Canada). For practical reasons, some exceptions to SI units are allowed.

Nomenclature and abbreviations

Authors should follow the rules recommended by the International Union of Biochemistry Committee of Editors of Biochemical Journals with support of IUPAC.

Enzymes

For enzyme nomenclature, *Enzyme Nomenclature (1992): Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (Academic Press, San Diego, Calif.) should be followed.

Drug trade names

Trade names of drugs may be mentioned in parentheses in the first text reference to a drug, but generic names should be used in the text, tables, and figures. When a trade name is used, it should be capitalized; generic or chemical names are not capitalized. The chemical nature of new drugs must be given when it is known. The form of drug used in calculations of doses (e.g., base or salt) should be indicated.

The manuscript

All parts of the manuscript, including references, tables, and figure captions should be double-spaced on 8.5 inch × 11 inch (or ISO A4) paper. Each page should be numbered, beginning with the title page.

Manuscript organization

All manuscripts should include in the following order: a title page, an abstract followed by key words, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, and Acknowledgements sections, references, tables, figure captions, and appendices. (See descriptions of each part of the manuscript, below.)

Presenting a manuscript to maximize its online discoverability

Authors can structure their manuscript to maximize its online discoverability by following a few simple guidelines. In particular, the wording of the title and abstract is especially important, because these are freely available to all readers and are used by a wide variety of systems to find and retrieve content, such as search engines, indexers, and digital catalogs. Consider the following suggestions:

- Include keywords in your abstract that are reflective of the paper. These should be included right in the text of the abstract, and can be repeated if it makes sense to do so. When choosing keywords, consider what words you yourself would enter into a search box if you were to search for your work online.
- Where possible and practical in the abstract, include synonyms for your keywords which laypersons would understand.
- Use your keywords in the body of the paper where appropriate.
- Ensure that abstracts are complete, such that they include a clear definition of the problem, methods, and results.

Title page (p. 1)

The title page should contain only the following information: the title, the authors' names, the institutes and addresses at which the research was done, the corresponding author's address, phone and fax numbers, and e-mail address. Titles provide information for contemporary alerting and information retrieval services, and should therefore be informative but brief.

Abstract and key words (p. 2)

The abstract must be one paragraph and less than 200 words; 7–10 key words must be included.

Graphical Abstracts

Authors are encouraged to submit a graphical abstract with their manuscripts. The purpose of a graphical abstract is to visually describe a concept or finding from the paper to entice readers and encourage understanding of the main message of the paper. The graphical abstract may consist of an illustration, diagram, equation, or other informative visual that serves to explain the subject of the article. Graphical abstracts appear online only.

Authors should note that the maximum allowable size of the final reproduction is 40 mm (150 pixels) high by 85 mm (320 pixels) wide. The graphical abstract must be submitted electronically during the manuscript submission process.

Introduction

Limit the introduction largely to the scope, purpose, and rationale of the study. Restrict the literature review and other background information to that needed in defining the problem or setting the work in perspective. An introduction generally need not exceed 375–500 words.

Materials and methods

Text should be written and arranged to ensure that the observations reported may be reproduced and (or) evaluated by readers. The degree of reproducibility of experiments should be indicated

either in general statements in Materials and methods and Results or, preferably, as statistical treatments of numerical data cited in tabular or graphic form. The experimental, or computational, material must be sufficiently detailed to permit reproduction of the work, but must be concise and avoid lengthy descriptions of known procedures; the latter should be specified by appropriate references.

Identify figures that have been digitally enhanced or modified, and provide the software and technique used.

Sources of biological materials, experimental methods, geographical locations, and statistical methods should be described. Sources of commercially available laboratory or field equipment and fine chemicals should be indicated in parentheses; list the company name, city, and country.

Experiments involving humans or animals

If results of an experimental investigation in human or animal subjects are reported, all authors (regardless of their country of origin) must specify whether ethical standards were used in their research. The editorial board reserves the right to request a confirmation letter from the authors' institutional ethics committee.

The Materials and Methods section of the manuscript must include the following:

1. A declaration of assurance that the experiment was reviewed and approved by the appropriate review committee at the institution(s) where the experiments were carried out. If an approval number is received it should be stated in the manuscript.
2. Authors who describe experiments on animals are required to provide a declaration of assurance that the animals were cared for in accordance with one of the following:
 - a) *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* (Vol. 1, 2nd ed., 1993, available from the Canadian Council on Animal Care (CCAC), 190 O'Connor St, Suite 800, Ottawa, ON K2P 2R3, Canada, or on their Web site at www.ccac.ca), or
 - b) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Eighth Edition, 2011, published by The National Academies Press, 2101 Constitution Ave. NW, Washington, DC 20055, USA)
3. Authors who describe experiments on humans are required to provide a declaration of assurance that that the experiment has been reviewed and approved by their institution's ethics review committee, and that the subjects have given informed consent prior to participating in the study.

Results

Limit the results to answers to the questions posed in the purpose of the work and condense them as comprehensively as possible. Material supplementary to the text can be archived in the report literature or a recognized data depository and referenced in the text (see Supplementary material section).

Databases

Authors of manuscripts reporting nucleic acid sequences are encouraged to submit the relevant data to the GenBank, EMBL, or DDBJ database, whichever is most convenient. The accession number of the sequence should be provided in the manuscript. Details regarding submission can

be obtained from the relevant database.

GenBank: gb-sub@ncbi.nlm.nih.gov EMBL: datasubs@embl-heidelberg.de DDBJ:
ddbjsub@ddbj.nig.ac.jp

Discussion

Limit the Discussion to giving the main contributions of the study and interpreting particular findings, comparing them with those of other workers. Emphasis should be maintained on synthesis and interpretation and exposition of broadly applicable generalizations and principles. If the Discussion is brief and straightforward, it can be combined with the Results section.

References

The author is responsible for verifying each reference against the original article. Authors wishing to use EndNote should select the style of the *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*.

Citations within the text

Each reference must be cited in the text using the surnames of the authors and the year, for example, (Walpole 1985) or Green and Brown (1990). If there are three or more authors, the citation should give the name of the first author followed by et al. (e.g., Green et al. 1991). If references occur that are not uniquely identified by the authors' names and year, use *a, b, c*, etc., after the year, for example, Green 1983*a*, 1983*b*; Green and Brown 1988*a*, 1988*b*, for the text citation and in the reference list.

Presentation of the list

References must follow the style used in current issues of the Journal. References must be listed in alphabetical order according to the name of the first author and not numbered.

References with the same first author are listed in the following order. (i) Papers with one author only are listed first in chronological order, beginning with the earliest paper. (ii) Papers with dual authorship follow and are listed in alphabetical order by the last name of the second author. (iii) Papers with three or more authors appear after the dual-authored papers and are arranged chronologically.

The names of serials are abbreviated in the form given in the *List of Journals Indexed for MEDLINE* (National Library of Medicine, National Institutes of Health, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894, USA; www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html). In doubtful cases, authors should write the name of the serial in full. The Journal encourages the inclusion of issue numbers, which should be placed in parentheses after the volume number.

Uniform resource locators (URLs) or digital object identifiers (DOIs) are useful in locating references on the Web, and authors are encouraged to include these; they should be added to the reference in the reference list.

References to unpublished reports, private communications, and papers submitted but not yet accepted are not included in the reference list but instead must be included as footnotes or in parentheses in the text, giving all authors' names with initials; for a private communication, year

of communication should also be given. References to non-refereed documents (e.g., environmental impact statements, contract reports) must include the address where they can be obtained.

Tables

Tables must be placed on separate pages after the reference list and numbered with Arabic numerals in the order cited in the text. The title of the table should be a concise description of the content, no longer than one sentence, that allows the table to be understood without detailed reference to the text. Footnotes in tables should be designated by lowercase italic superscript letters or by symbols (in the order *, †, ‡, §, ||, ¶, #). Descriptive material not designated by a footnote may be placed under a table as a Note. Symbols such as * and **, denoting levels of statistical significance, should be defined in conjunction with the actual values of the associated test statistic.

Equations

Equations should be represented in true editable format, preferably using a math editor (MathType); however, authors should insert simple inline equations in text without using MathType. When inserting symbols from Word's "Symbol" palette, authors should use the "normal text" or "symbol" fonts. Symbols should be inserted using MathType ONLY if they cannot be found in the "Symbol" palette under one of those two fonts.

Figure captions

Figure captions should be listed on a separate page and placed after the tables. The caption should informatively describe the content of the figure, without need for detailed reference to the text.

Appendices

An appendix should be able to stand alone, as a separate, self-contained document. Figures and tables used in an appendix should be numbered sequentially but separately from those used in the main body of the paper (e.g., Fig. A1, Table A1). If references are cited in an appendix, they must be listed in an appendix reference list, separate from the reference list for the article.

Supplementary material

Supplementary material may consist of extra tables, figures (maps), detailed calculations, and data sets that are not essential for understanding or evaluating the paper, and are not published with the article in the print edition of the journal. Supplementary material should be submitted with the article. During Web submission ([ScholarOne](#)), relevant files should be attached under "Supplementary data." Tables and figures should be numbered in sequence separate from those published with the paper (e.g., Fig. S1, Table S1). The supplementary material should be referred to in the printed article by footnotes.

Supplementary material will be available in its native file format on the journal Web site, via a link from the Web page of the associated article.

Illustrations

With the exception of fixing errors in figures, NRC Research Press will not be making any editing changes or corrections to the figures submitted by the authors, including units or labels in graphs. For the most part, figures will only be sized to fit appropriately within the layout of the manuscript.

Unless specifically noted, the following applies to all Journals.

Manuscripts containing illustrations that ignore the following specifications will be returned to the authors for appropriate revision prior to acceptance of the paper. See the electronic graphics list at <http://nrcresearchpress.com/page/authors/information/graphics> for accepted file formats.

Each figure or group of figures should be planned to fit, after appropriate reduction, into the area of either one or two columns of text. The maximum finished size of a one-column illustration is 8.6 cm × 23.7 cm (3.4 in. × 9.3 in.) and that of a two-column illustration is 18.2 cm × 23.7 cm (7.2 in. × 9.3 in.). Component figures must be combined into one figure. The figures (including halftones) must be numbered consecutively in Arabic numerals, and each one must be referred to in the text and must be self-explanatory. All terms, abbreviations, and symbols must correspond with those in the text. Only essential labelling should be used, with detailed information given in the caption. If various degrees of grey shading are used, ensure that they are varied enough to differentiate among them or you may need to also insert patterns over the greys (e.g., stippling, hatching). Submission of noncontinuous (screened) photographs and scanned illustrations is not acceptable, as moirés develop; a moiré is a noticeable, unwanted pattern generated by rescanning or rescreening an illustration that already contains a dot pattern.)

Line drawings

All lines must be sufficiently thick (0.5 points minimum) to reproduce well, and all symbols, superscripts, subscripts, and decimal points must be in good proportion to the rest of the drawing and large enough to allow for any necessary reduction without loss of detail. Avoid small open symbols; these tend to fill in upon reproduction. The same font style and lettering sizes should be used for all figures of similar size in any one paper. Original recorder tracings of **NMR, IR, ESR spectra**, etc., are not acceptable for reproduction; they must be redrawn.

Maps

Proper attribution must be given to the source of map data. Permission requirements can generally be found on the website of the map source, and attribution information generally appears on the bottom corner of the map. See attribution guidelines for Google Maps, for example, at <https://www.google.com/permissions/geoguidelines/attr-guide/>. Please provide the attribution information in the figure caption if it is not clearly visible on the map. Maps must have very **clear, bold patterns** and must show longitudes and latitudes (or UTM coordinates) and a scale, to ensure proper identification of study locations. On **maps of Quebec**, the official name of municipalities must be used (e.g., Québec, Montréal, Clarke City) and physical features must be in French (e.g., Lac Bienville) except for those that are considered of pan-Canadian significance (see list below). Areas of pan-Canadian significance have an official form in English and French (e.g., Atlantic Ocean and Océan Atlantique) and should appear in the

language of the paper. Quebec (the province) must also appear in the language of the paper. Names that should be presented in the language of the paper on a map of Quebec are as follows:

- Lake Abitibi / Lac Abitibi
- Anticosti Island / Île d'Anticosti
- Atlantic Ocean / Océan Atlantique
- Chaleur Bay / Baie des Chaleurs
- Hudson Strait / Détroit d'Hudson
- James Bay / Baie James
- Laurentian Mountains / Les Laurentides
- Ottawa River / Rivière des Outaouais
- Quebec (province) / Québec
- Restigouche River / Rivière Ristigouche
- Saguenay River / Rivière Saguenay
- Saint John River / Rivière Saint-Jean
- St. Lawrence River / Fleuve Saint-Laurent
- Gulf of St. Lawrence / Golfe du Saint-Laurent
- Lake Timiskaming / Lac Témiscamingue
- Ungava Bay / Baie d'Ungava

Photographs

Photographs should be continuous tone, of high quality, and with strong contrast. Only essential features should be shown. A photograph, or group of them, should be planned to fit into the area of either one or two columns of text **with no further reduction**. Electron micrographs or photomicrographs must include a scale bar directly on the illustration. Please do not use magnification. The best results will be obtained if the authors match the contrast and density of all figures arranged as a single plate.

Colour illustrations

Colour illustrations will be at the author's expense. Authors must submit a Colour Authorization Form with approval of the author or institution who will pay for the colour reproduction. Further details on prices are available from the Journal Editorial Office. Colour illustrations should use contrasting colours rather than colours very close in hue, or differentiate similar colours by inserting patterns over the colours (e.g., stippling, hatching). When a figure is to appear in colour online and in black and white in print, authors must supply only a single colour version of the illustration (rather than one colour version and one black-and-white version). The figure caption should provide a clear explanation of the figure whether the figure is being viewed in the online or print version of the Journal (for example, instead of "the red and blue symbols", write "the red circles and blue squares").

Structural drawings

Structures and schemes should be placed on separate pages (not within the text). Use of a computer drawing program such as ChemDraw or ChemWindows is highly recommended.

Single-width bold and broken lines are preferred to wedges for stereochemical notation; 12-pt Helvetica font should be used for atom labels.

Graphical abstracts

Graphical abstracts are published as part of the Table of Contents. The graphical abstract may consist of a small structural diagram, equation, or other informative drawing that serves to illustrate the subject of the article. Authors should note that the maximum allowable size of the final reproduction is 40 mm high by 85 mm wide without text (except necessary labels) and should plan accordingly. The graphical abstract must be submitted in an electronic format.

Preparation of electronic graphic files

NRC Research Press prefers the submission of illustrations, figures, and other artwork (such as multimedia) for accepted manuscripts in an electronic format and will use these electronic files whenever possible to ensure accuracy, clarity, and the highest level of detail.

See the electronic graphics list at <http://nrcresearchpress.com/page/authors/information/graphics> for accepted file formats.

Windows or Macintosh versions of True Type or Type 1 fonts should be used. **Do not use bitmap or nonstandard fonts.**

All figures should be submitted at the desired published size. For figures with several parts (e.g., a, b, c, d, etc.) created using the same software application, assemble them into one file rather than sending several files.

Remember that the more complex your artwork becomes, the greater the possibility for problems at output time. Avoid complicated textures and shadings, especially in vector illustration programs; this increases the chance for a poor-quality final product.

Bitmap (raster) files the proper resolution should be used when submitting bitmap artwork. The minimum requirements for resolution are 600 dpi for line art, 1200 dpi for fine lines (line art with fine lines or shading), 300 dpi for halftones and colour, and 600 dpi for combinations (halftones with lettering outside the photo area).

All **colour** files submitted must be as CMYK (cyan, magenta, yellow, and black). These colours are used in full-colour commercial printing. RGB graphics (red, green, and blue; colours specifically used to produce an image on a monitor) will not print correctly.

Vector files are image files produced using elements such as lines and shapes. Typically these files are used for line drawings.

Bitmaps inside vector files Bitmaps can be imported into vector/draw applications only for the purpose of adding and overlaying information, lines, text, etc. Bitmaps should not be resized, cropped, rotated, or otherwise manipulated after importing.

Multimedia files

The Journal allows authors to incorporate audio and video clips into their paper; these are published in the online version of the Journal, adding a dimension to the paper that cannot be achieved in the printed version. For submission guidelines and accepted formats, see the List of Accepted Graphic Files at <http://nrcresearchpress.com/page/authors/information/graphics>.