

INFLUÊNCIA DA VITAMINA C SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA HEPÁTICA E SUA ASSOCIAÇÃO A PARAOXONASE 1 DE CAMUNDONGOS C57BL/6 SUBMETIDOS À DIETA DE CAFETERIA

BETINA FERNANDA DAMBRÓS¹;

**GIOVANA RIBEIRO PEGORARO²; ÉVELYN DE SOUSA ARAÚJO³; MÔNICA
SCHIAVON DA COSTA⁴; RENATA TORRES ABIB⁵; SANDRA COSTA VALLE⁶;**

¹Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição – betinadambros@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição - giovana.pegoraro@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição - evelynsousa@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição – monica_schiavon@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição - renata.abib@ymail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição - sandracostavalle@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A vitamina C (Vit.C) é uma molécula hidrossolúvel, com alta capacidade de doar e/ou receber elétrons. Alguns mamíferos conseguem sintetizá-la no fígado a partir da glicose. Entretanto, seres humanos não expressam a enzima que catalisa a fase final da via de síntese da Vit.C, a *gulonolactona oxidase-GO*, tornando-os dependentes da ingestão alimentar para suprir suas necessidades diárias (STIPANUK, 2012). As funções biológicas da Vit.C são caracterizadas como enzimáticas e não enzimáticas. Entre as enzimáticas destacam-se suas ações como cofator em reações de hidroxilação da carnitina (carreadora de ácidos graxos), da prolina e lisina (estabilizadoras do colágeno), assim como a manutenção do estado redox celular (MANDL; SZARKA; BÁNHEGYI, 2009). Já suas funções não enzimáticas incluem o papel na absorção intestinal de ferro e sua capacidade de reagir com nitratos e nitritos no estômago, impedindo formação de compostos cancerígenos (STIPANUK, 2012).

Devido sua ação antioxidante da Vit.C inibe de forma eficaz a peroxidação lipídica, diminuindo o dano oxidativo aos lipídios biológicos (NOGUEIRA et al, 2013). Ao mesmo tempo, o organismo também conta com importantes antioxidantes endógenos, a exemplo da enzima paraoxonase 1 (PON1) (SHEKHANAWAR et al, 2013). Contudo, a relação entre os antioxidantes endógenos e exógenos tem sido amplamente investigada uma vez que as respostas mostram-se da dependência de múltiplos fatores, como por exemplo a composição da dieta ingerida.

A dieta de cafeteria ou dieta ocidentalizada é um modelo experimental de indução à obesidade, caracterizado pela ingestão de alimentos de alta densidade energética. Como resultado ocorre ganho de peso acelerado, aumento da gordura abdominal e, predisposição para parâmetros pré-diabéticos em animais experimentais (CAMPIÓN et al., 2006). Pesquisas experimentais sugerem uma menor atividade mitocondrial em animais induzidos a obesidade com dietas hipercalóricas. MCGARRY (2002) reúne evidências sobre a presença de acúmulo atípico de gordura entre as fibras musculares frente a obesidade e destaca o impacto dessa alteração no decréscimo da oxidação lipídica.

A Vit. C pode contribuir de maneira significativa sobre a regulação do gasto energético, da massa adiposa e do peso corporal, efeitos parcialmente atribuídos ao incremento da hidroxilação e disponibilidade de carnitina (NOEMAN; HAMOODA; BAALASH, 2011). Por outro lado, em roedores os efeitos da Vit.C parecem ser passíveis de regulação pelo teor de lipídios da alimentação. Com base nestas

evidências o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da Vit.C sobre a peroxidação lipídica hepática, assim como sobre a atividade da PON1 de camundongos C57BL/6, alimentados com dieta normocalórica ou dieta de cafeteria durante nove semanas.

2. METODOLOGIA

O ensaio biológico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPEL (código cadastro CEEA-9827). Para o experimento, 22 camundongos da linhagem C57BL/6, com aproximadamente 2 meses de idade, foram divididos aleatoriamente para constituir os tratamentos Controle e Vit.C, que foram novamente separados para receber alimentação padrão para roedores (normocalórica) ou dieta de cafeteria (hipercalórica). Constitui-se assim os grupos: Controle dieta normocalórica (Control-N); Controle dieta de cafeteria (Control-CAF); Vit.C dieta normocalórica (Vit.C-N) e Vit.C dieta de cafeteria (Vit.C-CAF). Os animais alimentados com dieta normocalórica receberam ração comercial AIN93-M para roedores. Aqueles mantidos em dieta de cafeteria receberam ração comercial associada a alimentos densamente calóricos, hiperpalatáveis e ricos em gorduras conforme a seguinte descrição: salgadinho (Baconzitos), salsicha (Itali), bacon (Santa Clara), bolacha recheada (Isabela), chocolate ao leite (Arcor) e leite condensado (Triângulo). Os grupos Control-N e Control-CAF receberam água *ad libitum*, enquanto que os grupos Vit.C-N e Vit.C-CAF receberam água *ad libitum* acrescida de Vit.C em pó (grau de pureza farmacêutica-Extractus Farmácia de Manipulação). A ingestão hídrica desses animais foi controlada para a manutenção da oferta de Vit.C na concentração de 9,0mg/kg de peso dos animais.

O experimento foi conduzido por 65 dias, sendo os 5 primeiros destinados à adaptação dos animais ao ambiente de laboratório e ao controle do consumo de dieta e líquidos. Os camundongos foram mantidos em caixas de polipropileno com temperatura e umidade relativa de 22-24°C e 65-75%, respectivamente, e ciclo claro/escuro de 12 horas, no Laboratório de Ensaios biológicos da Faculdade de Nutrição da UFPEL. A ingestão alimentar e de líquidos foi monitorada diariamente, já o peso foi verificado semanalmente. Ao final do período experimental os animais foram deixados em jejum de 12 horas (ração e água) durante a noite e sacrificados por decapitação. O sangue e os tecidos foram imediatamente coletados e processados para dosagens bioquímicas. Com o soro obtido, utilizando-se kits comerciais e obedecendo ao protocolo do fabricante, foram dosados albumina (g/L), glicose (mg/dL), colesterol total - CT (mg/dL) e triacilgliceróis - TG (mg/dL). A atividade da PON1 (kU/L) foi medida pela taxa de extinção de fenol. O teor de triglicerídeos hepático (mg/100mg de tecido úmido⁻¹) foi quantificado por colorimetria com kit comercial apropriado (Doles®), após homogeneização do tecido em solução salina na proporção de 1:5 (w:v). A peroxidação lipídica (nM/mg de proteína⁻¹) foi avaliada por meio da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e ajustada ao teor de proteína (Bradford). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). As análises foram realizadas utilizando o Software livre, BioEstat 5.3. A análise ANOVA de duas vias foi realizada para testar o efeito da Vit.C, da dieta e suas interações. Quando a interação foi significativa o teste t foi realizado para comparação entre grupos. O nível de significância adotado foi de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo experimental de dieta hipercalórica empregado neste estudo mostrou-se efetivo e pode ser evidenciado pelo maior peso corporal final ($p<0,05$; Tab.1) e pelo incremento de 60% no peso corporal dos animais em relação ao peso inicial (dados não mostrados em tabela). Nos animais alimentados com dieta de cafeteria o peso do tecido adiposo epididimal, assim como as concentrações séricas de glicose, TG e CT foram maiores comparados aos mantidos em dieta normocalórica ($p<0,05$; Tab.1). A Vit.C relacionou-se à menores quantidades de tecido adiposo e TG no grupo CAF comparado ao controle ($p<0,05$; Tab.1). Entretanto, o grupo Vit.C-N diminuiu o peso corporal, o tecido adiposo, o peso dos rins e as concentrações séricas de albumina, TG e CT vs grupo controle ($p<0,05$; Tab.1). Observou-se interação entre Vit.C e dieta sobre os efeitos observados nos pesos corporal e do tecido adiposo, assim como sobre o teor de CT ($p<0,05$; Tab.1).

O tratamento com Vit.C no grupo dieta normocalórica esteve associado a menores médias de albumina e de atividade da PON1 vs controle, além disso constatou-se interação entre Vit.C e dieta sobre albumina e PON1 ($p<0,05$; Tab.1). Os camundongos alimentados com dieta de cafeteria apresentaram médias superiores de TG-hepático vs aos alimentados com dieta normocalórica ($p<0,05$; Tab.1). No entanto, nesses últimos a Vit.C relacionou-se a menores médias de TG hepático vs grupo controle, encontrando-se interação entre estes fatores ($p<0,05$; Tab.1). Por outro lado, também a peroxidação lipídica foi menor no grupo Vit.C-N vs Control-N. Porém, esse efeito não foi constatado no grupo Vit.C-CAF ($p<0,05$; Tab.1).

Tabela 1. Características de consumo, de peso e avaliação bioquímica sérica e hepática de camundongos C57BL/6 tratados como controle ou com vitamina C e alimentados com dieta normo (N) ou hipercalórica (CAF) por nove semanas. (N=5 a 6).

	CONTROL		VIT. C		•P		
	N	CAF	N	CAF	Dieta	Vit.C	Interação
	Média (±DP)				Valor		
Peso Corporal Final (g)	28,63(1,27)	42,50 (2,98)*	19,87(2,62)*	43,97 (7,69)*	<0,0001	0,0119	0,0009
Peso dos Órgãos (g)							
Fígado	1,37 (0,15)	1,44 (0,20)	0,69 (0,13)*	1,58 (0,44)	<0,0001	0,0727	0,1227
Tecido Adiposo Epididimal	0,18 (0,08)	2,14 (0,27)	0,01 (0,04)*	1,28 (0,68)**	<0,0001	0,0051	0,0463
Rins	0,30 (0,03)	0,37 (0,02)	0,25 (0,04)*	0,36 (0,02)	<0,0001	0,0026	0,0338
Avaliação Bioquímica							
<u>Sérica</u>							
Albumina (g/dL)	1,44 (0,31)	1,23 (0,11)	0,64 (0,34)*	1,37 (0,32)	0,0235	0,0235	0,0006
Glicose (mg/dL)	70,97(21,17)	195,7 (44,59)*	40,18 (21,62)*	160,9(69,78)*	< 0,0001	0,4617	0,7407
CT (mg/dL)	94,86 (22,74)	151,7 (20,12)*	48,57 (18,90)*	162,3 (16,75)*	< 0,0001	0,1762	0,0110
TG (mg/dL)	58,30 (13,87)	127,4 (26,10)*	34,98 (10,72)*	99,24 (15,43)**	< 0,0001	0,0048	0,8476
PON1 (kU/L)	101,6 (8,43)	93,63 (12,15)	60,86 (14,53)*	87,79(18,75)	0,1789	0,0024	0,0121
<u>Hepática</u>							
TG (mg/100mg de Tecido ⁻¹)	2,82 (0,74)	4,03 (0,62)	1,49 (0,50)*	4,67 (1,57)*	< 0,0001	0,4276	0,0321
TBA-RS (nM/mg de Proteína ⁻¹)	2,33 (0,27)	2,47 (0,22)	2,19 (0,29)*	2,87 (0,36)	0,0097	0,4642	0,0770

*indica diferença significativa comparada a Control – Norm; ** indica diferença significativa comparada a Control – CAF; #indica diferença significativa comparado a Vit.C CAF.

Neste estudo o tratamento com vitamina C de fonte sintética, na concentração de 9mg/kg/dia, dissolvida e administrada com água, resultou em efeitos associados

a vitamina. Porém, estes foram mais evidentes em animais alimentados com uma dieta normocalórica, sugerindo que a resposta ao tratamento com Vit.C exógena depende das características da dieta administrada aos camundongos.

Os resultados obtidos sobre a peroxidação lipídica diferem de outros já realizados. Contudo, podem ser compatíveis frente ao entendimento de que a dieta hiperlipídica pode exercer modulação positiva da GO com o objetivo de compensar o dano oxidativo. Tranberg, Hansen, Lykkesfeldt (2014) sugerem que camundongos alimentados com dieta hipercalórica tem a capacidade de aumentar o turnover da vitamina, estimulando sua re-síntese e mobilização no fígado. Nesse contexto, o tratamento com Vit.C exógena pode interferir de forma limitada sobre o sistema já alterado. Em contraste, quando os animais foram alimentados com dieta normocalórica, o tratamento com Vit.C restringiu a peroxidação lipídica (TBA-RS). Quanto a redução da PON1 no grupo Control-N, de forma similar a este estudo Cézar et al, observaram menor atividade enzimática ao analisarem os efeitos da suplementação dietética de Vit.C, utilizando 750 mL/dia de suco de laranja, durante 60 dias em humanos.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que o tratamento com Vit.C reduziu a peroxidação lipídica hepática, contudo também diminuiu a atividade da PON1 de animais alimentados com dieta normocalórica. Em contraste, a Vit.C não afetou esses parâmetros em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta de cafeteria durante nove semanas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MANDL, J; SZARKA, A; BÁNHEGYI, G. Vitamin C: Update on Physiology and Pharmacology. **British Journal of Pharmacology**, v.157, n.7, p.1098-1106, 2009.

MCGARRY JD. Dysregulation of Fatty Acid Metabolism in the Etiology of Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v.51, p.7-16, 2002.

NOEMAN SA, HAMOODA HE, BAALASH AA. Biochemical Study of Oxidative Stress Markers in the Liver, Kidney and Heart of High Fat Diet Induced Obesity in Rats. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v.3, n.7, p.2-6, 2011.

NOGUEIRA CR, BORGES F, LAMEU E, FRANCA C, RAMALHO A. Effects of supplementation of antioxidant vitamins and lipid peroxidation in critically ill patients. **Nutr Hosp**, v.28, n.5, p.1668-1671, 2013.

STIPANUK, MH. **Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition**. Philadelphia: W. B Saunders Company, 2000.

TRANBERG B, HANSEN AK, LYKKESFELDT J. High-fat feeding increases hepatic vitamin C synthesis and its circulatory mobilization in mice. **Eur J Nutr**, v.53, n.6, p. 1442-1444, 2014.