

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA C SOBRE CONSUMO ENERGÉTICO, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E ATIVIDADE DA ENZIMA PARAOXONASE 1, EM CAMUNDONGOS C57BL/6 EXPOSTOS À DIETA DE CAFETERIA

GIOVANA RIBEIRO PEGORARO¹; ITIANE BARCELLOS JASKULSKI²; MÔNICA SCHIAVON DA COSTA³; POLIANA ESPÍNDOLA CORREIA⁴; CAROLINE RODRIGUES BITENCOURT⁵; SANDRA COSTA VALLE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas - giovana.pegoraro@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - itianebarcellos@hotmail.com;

³Universidade Federal de Pelotas - monica_schiavon@yahoo.com.br;

⁴Universidade Federal de Pelotas - espindola.poliana@gmail.com;

⁵Universidade Federal de Pelotas - carol.r.bitencourt@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas - sandracostavalle@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A importância da vitamina C (Vit.C) revelou-se a partir da descoberta do escorbuto, mas atualmente diversos estudos investigam seu efeito antioxidante. Inúmeras evidências indicam que a Vit.C previne de forma eficaz a peroxidação lipídica, protegendo contra o dano oxidativo as membranas celulares e as lipoproteínas circulantes no sangue (COZZOLINO e SILVA, 2012). Contudo, recentes estudos ampliam as ações da vitamina sugerindo sua associação ao controle do gasto energético e ao equilíbrio metabólico. Nesse contexto, surgem estudos investigando a relação entre Vit.C e seu efeito frente a dietas hipercalóricas, ricas em gordura, açúcar e sódio.

CAMPIÓN et al. (2006) mostraram que a suplementação de Vit.C foi capaz de promover a redução do peso corporal, da gordura total e subcutânea, a insulinemia e melhorar a homeostase da glicose em ratos induzidos à obesidade com dieta de cafeteria. ETENG et al. (2006) verificaram que o tratamento com Vit.C associou-se significativamente a redução do colesterol total (CT) e dos triglicerídeos (TG) em ratos *Wistar* albinos induzidos à obesidade. NASCIMENTO et al. (2012) mostraram que a suplementação dietética de uma fonte rica em Vit.C, suco de camu-camu, diminuiu significativamente a concentração de CT em ratos obesos.

Associada fisicamente à partícula de lipoproteína de alta densidade (HDL) está a enzima paraoxonase1 (PON1) a qual inibe de maneira eficaz a peroxidação lipídica das partículas de HDL e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (JARVIK et al., 2002). Vários fatores parecem interferir significativamente na atividade enzimática. Além disso, sua resposta frente ao aumento de antioxidantes exógenos parece estar na dependência de múltiplos fatores, especialmente em roedores (CORREIA e ALVES, 2009).

A dieta de cafeteria ou dieta ocidentalizada é um modelo experimental de indução à obesidade e síndrome metabólica, que caracteriza-se pela ingestão de alimentos de alta densidade energética e altamente palatáveis (CAMPIÓN et al., 2006). A exposição à dieta promove hiperfagia, resultando em ganho de peso acelerado, aumento da gordura abdominal e, predisposição para parâmetros pré-diabéticos em animais experimentais (THOMÁS-MOYÁ et al., 2008).

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da Vit.C sobre características de consumo energético, parâmetros bioquímicos e atividade da PON1 em

camundongos C57BL/6 alimentados com dieta normocalórica ou dieta de cafeteria por nove semanas.

2. METODOLOGIA

O ensaio biológico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (código cadastro CEEA-9827). Foram utilizados 22 camundongos machos da linhagem C57BL/6, com 2 meses de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: Dieta normocalórica ($n=5$, ração padrão AIN3 + água *ad libitum*); Dieta normocalórica + Vit.C ($n=5$, ração padrão AIN3 + água *ad libitum* + Vitamina C (9,0 mg/kg/Peso corporal-PC)); Dieta de cafeteria ($n=6$, ração padrão AIN3 + salsicha, bacon, salgadinho, leite condensado, biscoito recheado e chocolate + água *ad libitum*) e Dieta de cafeteria + Vit.C ($n=6$, ração padrão AIN3 + salsicha, bacon, salgadinho, leite condensado, biscoito recheado e chocolate + água *ad libitum* + vitamina C (9mg/kg/PC)). Foi utilizada Vit.C em pó, grau de pureza farmacêutica (Extractus Farmácia de Manipulação, Pelotas, RS-Brasil).

O experimento foi conduzido num total de 65 dias, sendo os 5 primeiros destinados à adaptação dos animais ao ambiente e ao consumo de dieta e líquidos. O ensaio biológico foi desenvolvido no Laboratório de Ensaios Biológicos da Faculdade de Nutrição da UFPel, onde os camundongos permaneceram em temperatura e umidade relativa entre 22-24°C e 65-75%, respectivamente, sob ciclo claro/escuro de 12 horas. A ingestão alimentar foi monitorada diariamente, e a diferença em gramas/mL entre a quantidade ofertada e a quantidade restante no dia seguinte, registrada em planilhas de controle. A determinação do ganho e/ou perda de peso foi obtida através da pesagem semanal dos animais, em balança eletrônica.

A eutanásia ocorreu após o 65º dia de tratamento. Previamente, os camundongos foram deixados em jejum de 12 horas (ração e água), e em seguida submetidos ao procedimento de decapitação conforme a Resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária nº 714 de junho de 2002, seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2004). O sangue foi coletado no momento da decapitação e centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos. O soro obtido foi transferido para Eppendorfs e congelado a -20°C até o momento das análises. Foram excisados cirurgicamente e imediatamente pesados o fígado, os rins e o tecido adiposo epididimal. Após a obtenção do soro, utilizando-se kits comerciais, com base nas recomendações dos fabricantes, realizou-se a quantificação colorimétrica de albumina (Doles®, GO-Brasil), glicose (Doles®, GO-Brasil), triacilgliceróis-TG (Vida Biodiagnóstica®, MG-Brasil) e colesterol total-CT (Vida Biodiagnóstica®, MG-Brasil). A atividade arilesterase da PON1 foi medida a partir da velocidade de formação de fenol através do aumento da absorbância a 270 nm, em espectrofotômetro. As amostras foram diluídas 1:3 em 20 mm de Tampão Tris/HCl, pH 8,0, contendo 1 mm de CaCl₂. A solução reagente foi o tampão Tris/HCl, adicionado de 4 mm de fenilacetato. A absorbância foi mensurada por 60 segundos e o resultado obtido em kU/L.

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (\pm DP). 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%. Para as análises foi utilizado o Software GraphPad Prism 5.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dieta de cafeteria utilizada no presente estudo revelou grande aceitação, constatada por um consumo energético três vezes maior comparado aos controles ($p<0,05$; Tab.1). Constatou-se uma notável redução no consumo de ração padrão (RP) nos grupos dieta de cafeteria que receberam de forma associada alimentos hiperpalatáveis ($p<0,05$; Tab.1). Estes resultados deram-se provavelmente a uma alteração na percepção do paladar, onde, a RP passa a ser preterida, pois torna-se menos atrativa frente aos estímulos ocasionados por estes alimentos hiperpalatáveis. Já a vitamina C associou-se a um menor consumo de RP nas duas dietas testadas ($p<0,05$; Tab.1), o que pode indicar uma influência da Vit.C administrada em doses elevadas sobre o paladar, favorecendo a percepção de sabores intensos, quando presentes na alimentação de camundongos C57BL/6.

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

	NORM		CAF		P		
	CONTROL	VIT.C	CONTROL	VIT.C	Dieta	Vit.C	Interação
	Média (\pm DP)						Valor
Consumo							
Energético (kcal/dia)	11,81 (2,11)	8,73 (1,03) ^{**}	114,86 (3,42) [*]	114,34 (2,87) [*]	<0,001	0,012	0,014
Líquidos (mL/dia)	5,73 (0,93)	4,00 (1,41)	4,67 (1,15)	3,28 (1,74)	0,273	0,067	0,830
Peso Corporal Final (g)	28,63(1,27)	19,87(2,62) ^{**}	42,50 (2,98) [*]	43,97 (7,69) [*]	<0,001	0,012	0,001
Peso dos Órgãos (g)							
Fígado	1,37 (0,15)	0,69 (0,13) ^{**}	1,44 (0,20)	1,58 (0,44)	<0,001	0,073	0,122
Tecido Adiposo Epididimal	0,18 (0,08)	0,09 (0,00) ^{**}	2,14 (0,27) [*]	1,28 (0,68) ^{*#}	<0,001	0,005	0,046
Rins	0,30 (0,03)	0,25 (0,04) ^{**}	0,37 (0,02) [*]	0,36 (0,02) [*]	<0,001	0,002	0,034
Avaliação Bioquímica							
Albumina (g/dL)	1,44 (0,31)	0,64 (0,34) ^{**}	1,23 (0,11)	1,37 (0,32)	0,178	0,002	0,012
Glicose (mg/dL)	70,97(21,17)	40,18 (21,62) ^{**}	178,54(34,59) [*]	169,6(69,78) [*]	< 0,001	0,438	0,784
CT (mg/dL)	84,86 (22,74)	46,57 (18,90) ^{**}	151,7 (20,12) [*]	154,3 (16,75) [*]	< 0,001	0,080	0,033
TG (mg/dL)	58,30 (13,87)	34,98 (10,72) ^{**}	127,4 (26,10) [*]	99,24 (15,43) ^{*#}	< 0,001	0,004	0,847
PON1 (kU/L)	101,6 (8,43)	60,86 (14,53) ^{**}	93,63 (12,15)	87,79(18,75)	0,1789	0,0024	0,0121

Indicam diferença significativa ($p<0,05$) test t: *comparado ao grupo dieta normocalórica controle; **comparado a dieta de cafeteria com Vit.C

comparado a dieta de cafeteria controle

O efeito da vitamina C sobre o peso corporal já foi mostrado em outras pesquisas ao administrarem 750 mg/kg de vitamina C adicionada à água, durante 56 dias, a ratos *Wistar* (CAMPIÓN et al., 2006). No atual estudo o efeito da vitamina sobre o PC foi mais evidente em animais alimentados com dieta normocalórica ($p<0,05$; Tab.1), sugerindo que a resposta ao tratamento com Vit.C exógena depende das características da dieta administrada aos camundongos.

Quanto a concentração sérica de glicose a Vit.C relacionou-se a médias menores em ambas dietas ($p<0,05$; Tab.1). Contudo, nos animais mantidos em dieta normocalórica a redução foi de 42% ($p<0,05$), já na dieta de cafeteria foi de 5% ($p>0,05$). Em estudo semelhante pesquisadores inferiram que a vitamina poderia ser importante para a homeostase da glicose por inibir a formação de produtos de glicação, proporcionando uma melhor oxidação da glicose (CAMPIÓN et al., 2006).

No atual estudo apenas os camundongos alimentados com dieta normocalórica mostraram redução do CT quando tratados com Vit.C ($p<0,05$; Tab.1). Outros estudos inferem que a Vit.C ativaría a enzima 7-a-hidroxilase, envolvida na

conversão do colesterol em ácidos biliares, ocasionando diminuição dos níveis sanguíneos de colesterol (ETENG et al., 2006). Já TG foi menor (40 a 20%, respectivamente) nos grupos dieta normocalórica e cafeteria tratados com Vit.C comparados aos controles ($p<0,05$; Tab.1). Este efeito revelou interação entre dieta e Vit.C ($p<0,05$; Tab.1). Estes resultados poderiam ser resultado da melhora na eficiência da β -oxidação como observado em outros estudos.

Com relação a PON1, o tratamento com Vit.C associou-se a redução na atividade da enzima no grupo mantido em dieta normocalórica ($p<0,05$; Tab.1). Contudo, no grupo alimentado com dieta de cafeteria o tratamento com Vit. C não alterou a atividade da PON1($p>0,05$; Tab.1). Estudos mostraram que ratos *Wistar* alimentados com dieta hipercalórica durante 14 semanas, apresentaram redução na atividade da PON1 (THOMÁS-MOYÁ et al., 2008). Entretanto, no atual estudo a maior atividade da PON1 observada no grupo dieta de cafeteria, comparado ao dieta normocalórica foi atribuído a Vit.C e não a dieta ($p<0,05$; Tab.1).

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que a Vit.C associou-se à redução do tecido adiposo e do TG sérico, sem interferir no consumo energético e na atividade da PON1 de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta de cafeteria. Em contraste, a Vit.C influenciou a redução do consumo energético, peso corporal, tecido adiposo, dos parâmetros bioquímicos e na atividade da PON1 de animais alimentados com dieta normocalórica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COZZOLINO, S.M.F.; SILVA, V.L. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 4^a.ed. Barueri, São Paulo, Brasil, 2012. p. 409-426.
- CAMPIÓN, J.; MILAGRO, F.I.; FERNÁNDZ, D.; MARTINÉZ, J.A. Differential gene expression and adiposity reduction induced by ascorbic acid supplementation in a cafeteria model of obesity. **Journal of Physiology and Biochemistry** – Pamplona, Spain, v.62, p. 71-80, 2006.
- THOMÁS-MOYÁ, E.; PÉREZ, Y.G.; FIOL, M.; GIANOTTI, M.; LLADÓ, I.; PROENZA, A.M. Gender related differences in paraoxonase 1 response to high-fat diet-induced oxidative stress. **Nature Publishing Group** – Palma de Mallorca, Spain, v.16, p. 2232-2238, 2008.
- NASCIMENTO, O.V.; BOLETI, A.P.A.; YUYAMA, L.K.O.; LIMA, E.S. Effects of diet supplementation with Camu-camu fruit in a rat model of diet-induced obesity. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences** – Manaus, AM, Brasil, v.85, p.355-363, 2012.
- JARVIK, G.P.; TSAI, N.T.; MCKINSTRY, L.A.; WAN, R.; BROOPHY, V.H.; RITCHER, R.J. et al. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. **Journal of the American Heart Association** – Dallas, Texas, v. 22, p.1329-1333, 2002.
- CORREIA, J.D.; SCHWEIGERT, I.D.; ALVES, B. **Modulação dietética das paraoxonases: Revisão de estudos em humanos**. 2009. 45f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.
- ETENG, M.U.; IBEKWE, H.A.; AMATEY, T.E.; BASSEY, B.J.; UBOH, F.U.; OWU, D.U. Effect of vitamin C on serum lipids and electrolyte profile of albino wistar rats. **Nigerian Journal of Physiological Sciences** – Calabar, Nigéria, v.21, p. 15-19, 2006.
- COBEA. **Princípios éticos na experimentação animal**. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/>. Acesso em: 8 de set 2012.