

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILA BITENCOURT BRITO

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO AZEITE DE OLIVA EXTRAVIRGEM EM
INTERAÇÃO COM PADRÕES DIETÉTICOS OCIDETAL E ORIENTAL SOBRE A
MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS AO METABOLISMO
LIPÍDICO POR MEIO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

CURITIBA

2021

PRISCILA BITENCOURT BRITO

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO AZEITE DE OLIVA EXTRAVIRGEM EM
INTERAÇÃO COM PADRÕES DIETÉTICOS OCIDETAL E ORIENTAL SOBRE A
MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS AO METABOLISMO
LIPÍDICO POR MEIO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Dissertação apresentada ao curso de Pós
Graduação em Genética, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre em
Genética

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Viater Tureck
Coorientadora: Profa. Dra. Lupe Furtado Alle

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Brito, Priscila Bitencourt

Investigação do efeito do azeite de oliva extravirgem em interação com padrões dietéticos ocidental e oriental sobre a modulação da expressão de genes associados ao metabolismo lipídico por meio de experimentação animal. / Priscila Bitencourt Brito. – Curitiba, 2021.

79 p.: il.

Orientador: Luciane Viater Tureck.

Coorientadora: Lupe Furtado Alle.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Azeite de oliva. 2. Compostos fitoquímicos. 3. Genes. 4. Reguladores do metabolismo de lipídeos. 5. Dieta ocidental. 6. Dieta oriental. I. Título. II. Tureck, Luciane Viater, 1984. III. Alle, Lupe Furtado. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (22. ed.) 641.3463



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **PRISCILA BITENCOURT BRITO** intitulada: **Investigação do efeito do azeite de oliva extra virgem em interação com padrões dietéticos ocidental e oriental sobre a modulação da expressão de genes associados ao metabolismo lipídico por meio de experimentação animal**, sob orientação da Profa. Dra. LUCIANE VIATER TURECK, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 14 de Maio de 2021.

Assinatura Eletrônica

23/05/2021 15:51:32.0

LUCIANE VIATER TURECK

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

18/05/2021 10:23:58.0

MARCIA HOLSBACK BELTRAME

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

18/05/2021 08:33:30.0

ANA CLAUDIA MARTINS BRAGA GOMES TORRES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1587 - E-mail: ppg-gen@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 91580

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.pppg.ufpr.br/siga/validante/autenticacaoassinatura.jsp>
e insira o código 91580

Dedico essa dissertação à minha amada mãe, Izabel.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe, Izabel, que sempre me incentivou nesta jornada, me deu seu apoio e torceu por minhas conquistas em cada momento.

Agradeço ao meu gentil e carinhoso noivo, Fabio, que entendeu meus sacrifícios ao longo desses anos, me acalmou nos momentos de ansiedade, me apoiou e sempre se interessou em saber sobre o meu trabalho, assim como comemorou comigo cada pequena etapa vencida.

Agradeço a minha colega de equipe, Mayza, pelos ensinamentos, amizade e companheirismo neste projeto.

Agradeço, também, a minha orientadora, Luciane, que me acolheu como sua aluna, teve paciência em muitos momentos, me mostrou os caminhos a seguir até a conclusão desse lindo trabalho.

Por fim, agradeço a Deus por me permitir viver tudo isso.

RESUMO

O consumo de azeite de oliva extravirgem, reconhecido como composto bioativo benéfico para a saúde, é importante no contexto nutrigenômico de um indivíduo com padrão de alimentação saudável. Neste sentido, pode-se separar os padrões alimentares em dois grandes grupos, sendo a alimentação ocidental caracterizada pelo consumo de alimentos industrializados, carnes processadas, grãos refinados, leite e derivados e elevadas quantidades de açúcares, e uma dieta tipicamente oriental baseada na ingestão de grãos integrais, peixes, frutas e leguminosas. A alimentação se faz importante na manutenção da saúde do indivíduo, juntamente com práticas regulares de exercícios físicos. Esse conjunto funciona como fator de prevenção de eventos cardiovasculares, os quais estão entres as principais causas de morte no mundo. Dentro desse panorama de estilo de vida saudável e eventos cardiovasculares encontram-se as dislipidemias. Caracterizadas pela alteração dos níveis normais de lipídeos, têm sua classificação laboratorial vinculada aos valores referenciais de lipoproteínas séricas (LDL, HDL, VLDL, triglicerídeos e colesterol). Quando os valores dessas lipoproteínas estão fora do seu limite de normalidade são preditivas de fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Neste cenário, verifica-se a relação entre a qualidade da alimentação e desenvolvimento de diferentes dislipidemias em populações com padrões alimentares distintos. Com base nisso, o objetivo desse trabalho foi investigar se o consumo de azeite de oliva extravirgem, frente a esses diferentes padrões alimentares teria ação modulatória na expressão de genes envolvidos no perfil lipídico, como *APOE*, *APOB* e *LIPC* em 56 ratas (fêmeas), divididas aleatoriamente em grupos que receberam rações com características da alimentação ocidental mais suplemento de azeite de oliva extravirgem (Western mais suplemento), grupo controle que recebeu apenas a ração com características de alimentação ocidental (Western). outro grupo que recebeu ração com características da alimentação oriental mais o suplemento de azeite de oliva extravirgem (Eastern mais suplemento) e seu respectivo controle que recebeu apenas a ração com característica da alimentação oriental (Eastern), num período de 14 semanas. Após esse período houve a eutanásia dos animais e extração de tecido adiposo, fígado e sangue para as análises de expressão dos genes selecionados com kits da Thermo Fischer Scientific e perfil lipídico com kits da LabTest diagnóstica. As análises de comparação de média de expressão demonstraram que apenas a expressão do gene *LIPC* teve diferença frente o consumo de azeite de oliva juntamente com uma dieta equilibrada ($p=0,001$ no tecido hepático e $p=0,01$ no tecido adiposo). No tecido adiposo, dentro do grupo Western, independente de receber suplementação, a expressão de *APOE* teve relação com a dosagem de glicose ($p=0,004$). Na análise de correlação das lipoproteínas, os níveis médios de triglicerídeos se apresentaram mais baixos no grupo Eastern com suplemento do que nos grupos Eastern ($p=0,02$), comparados aos animais do grupo Western mais suplemento ($p=0,003$) e apenas Western ($p=3,7 \times 10^{-4}$). Diante desse contexto pode-se sugerir que o azeite de oliva extravirgem possui efeito modulador sobre o gene *LIPC* quando administrado juntamente com uma dieta equilibrada.

Palavras-chave: composto bioativo, azeite de oliva extravirgem, genes do perfil lipídico, dietas Western Eastern

ABSTRACT

The consumption of extra virgin olive oil, recognized as a bioactive compound beneficial to health, is important in the nutrigenomic context of an individual with a healthy eating pattern. In this sense, dietary patterns can be separated into two large groups, with Western food being characterized by the consumption of processed foods, processed meats, refined grains, milk and dairy products and high amounts of sugar, and a typically oriental diet based on the intake of whole grains, fish, fruits and pulses. Food is important in maintaining the individual's health, along with regular physical exercise. This set works as a prevention factor for cardiovascular events, which are among the leading causes of death in the world. Within this panorama of healthy lifestyle and cardiovascular events are dyslipidemias. Characterized by changes in normal lipid levels, their laboratory classification is linked to reference serum lipoprotein values (LDL, HDL, VLDL, triglycerides and cholesterol). When the values of these lipoproteins are outside their normal range, they are predictive of a risk factor for the development of cardiovascular diseases. In this scenario, there is a relationship between the quality of food and the development of different dyslipidemias in populations with different dietary patterns. Based on this, the aim of this study was to investigate whether the consumption of extra virgin olive oil, in view of these different dietary patterns, would have a modulatory action on the expression of genes involved in the lipid profile, such as APOE, APOB and LIPC in 56 female rats. randomly divided into groups that received rations with Western dietary characteristics plus extra virgin olive oil supplement (Western plus supplement), control group that received only rations with Western dietary characteristics (Western). another group that received feed with characteristics of oriental food plus extra virgin olive oil supplement (Eastern plus supplement) and its respective control that received only feed with characteristic of oriental food (Eastern), in a period of 14 weeks. After this period, the animals were euthanized and adipose tissue, liver and blood were extracted to analyze the expression of genes selected with kits from Thermo Fischer Scientific and lipid profile with kits from LabTest diagnostics. The comparison analysis of mean expression showed that only the expression of the LIPC gene was different from the consumption of olive oil along with a balanced diet ($p=0.001$ in liver tissue and $p=0.01$ in adipose tissue). In adipose tissue, within the Western group, regardless of receiving supplementation, APOE expression was related to glucose dosage ($p=0.004$). In the lipoprotein correlation analysis, the mean triglyceride levels were lower in the Eastern group with supplement than in the Eastern groups ($p=0.02$), compared to animals in the Western plus supplement group ($p=0.003$) and Western only ($p=3.7 \times 10^{-4}$). In this context, it can be suggested that extra virgin olive oil has a modulating effect on the LIPC gene when administered along with a balanced diet.

Keywords: bioactive compound, extra virgin olive oil, lipid profile genes, Western Eastern diets

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESTRUTURA LIPOPROTEICA.....	27
FIGURA 2 - CICLOS DE TRANSPORTE DE LÍPIDES NO PLASMA.....	28
FIGURA 3 - DELINEAMENTO ESQUEMÁTICO DA PESQUISA.....	45
FIGURA 4 - EXPRESSÃO DO GENE <i>APOB</i> NOS TECIDOS DE FÍGADO E ADIPOSO DE ANIMAIS SUBMETIDOS AS DIETAS WESTERN COM SUPLEMENTO, WESTERN CONTROLE, EASTERN COM SUPLEMENTO E EASTERN CONTROLE.....	51
FIGURA 5 - EXPRESSÃO DO GENE <i>APOE</i> NOS TECIDOS DE FÍGADO E ADIPOSO DE ANIMAIS SUBMETIDOS AS DIETAS WESTERN COM SUPLEMENTO, WESTERN CONTROLE, EASTERN COM SUPLEMENTO E EASTERN CONTROLE.....	52
FIGURA 6 - EXPRESSÃO DO GENE <i>LIPC</i> NOS TECIDOS DE FÍGADO E ADIPOSO DE ANIMAIS SUBMETIDOS AS DIETAS WESTERN COM SUPLEMENTO, WESTERN CONTROLE, EASTERN COM SUPLEMENTO E EASTERN CONTROLE.....	53
FIGURA 7 - NÍVEIS MÉDIOS DE TRIGLICERÍDEOS (mg/dL) NOS ANIMAIS SUBMETIDOS AS DIETAS WESTERN COM SUPLEMENTO DE AZEITE DE OLIVA, WESTERN CONTROLE, EASTERN COM SUPLEMENTO DE AZEITE DE OLIVA E EASTERN CONTROLE.....	56
FIGURA 8 - NÍVEIS MÉDIOS DE COLESTEROL TOTAL (mg/dL) NOS ANIMAIS SUBMETIDOS AS DIETAS WESTERN COM SUPLEMENTO DE AZEITE DE OLIVA, WESTERN CONTROLE, EASTERN COM SUPLEMENTO DE AZEITE DE OLIVA E EASTERN CONTROLE.....	57
FIGURA 9 - NÍVEIS MÉDIOS DE GLICOSE (mg/dL) NOS ANIMAIS SUBMETIDOS AS DIETAS WESTERN COM SUPLEMENTO DE AZEITE DE OLIVA, WESTERN CONTROLE, EASTERN COM SUPLEMENTO DE AZEITE DE OLIVA E EASTERN CONTROLE.....	57
FIGURA 10 - MÉDIA DO PESO FINAL DOS ANIMAIS (g) E DELTA PESO (g) NOS ANIMAIS SUBMETIDOS AS DIETAS WESTERN COM SUPLEMENTO DE AZEITE DE OLIVA, WESTERN CONTROLE, EASTERN COM SUPLEMENTO DE AZEITE DE OLIVA E EASTERN CONTROLE.....	58

FIGURA 11 - CONSUMO MÉDIO DOS ANIMAIS (g) SUBMETIDOS AS DIETAS
WESTERN COM SUPLEMENTO DE AZEITE DE OLIVA, WESTERN
CONTROLE, EASTER COM SUPLEMTENTO DE AZEITE DE OLIVA E
EASTER CONTROLE.....59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - EXEMPLOS DE ALIMENTOS FUNCIONAIS QUE CONTÊM COMPONENTES BIOATIVOS.....	34
TABELA 2 - INFORMAÇÕES NUTRICIONAIS DAS DIETAS WESTERN E EASTER.....	46
TABELA 3 - INFORMAÇÕES NUTRICIONAIS DO AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM – VENTA DEL BARON POR 100ML.....	47
TABELA 4 - NÚMERO AMOSTRAL OBTIDO PARA CADA VARIÁVEL ANALISADA.....	49
TABELA 5 - MODELOS DE ANÁLISES DE REGRESSÃO MÚLTIPLA NO GRUPO DE ANIMAIS SUBMETIDOS A DIETA WESTERN.....	53
TABELA 6 - MODELOS DE ANÁLISES DE REGRESSÃO MÚLTIPLA NO GRUPO DE ANIMAIS SUBMETIDOS A DIETA EASTERN.....	54
TABELA 7 - INFORMAÇÕES SOBRE MÉDIA E VALOR DE O PARA GANHO DE PESO, PESO FINAL E INGESTÃO ALIMENTAR DOS ANIMAIS.....	59
TABELA 8 - ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES APOB, APOE E LIPC NO FÍGADO E TECIDO ADIPOSEO E VARIÁVEIS COLETADAS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS WESTERN SUPLEMENTADO E WESTERN CONTROLE.....	60
TABELA 9 - ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES APOB, APOE E LIPC NO FÍGADO E TECIDO ADIPOSEO E VARIÁVEIS COLETADAS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS EASTERN SUPLEMENTADO E EASTERN CONTROLE.....	61

LISTA DE SIGLAS

ABC-A1- ATP - Binding Cassete A1
ACAT - Acil-CoA:Colestril Aciltransferase
ACTH - Adrenocorticotropic hormone
AG - Ácidos graxos
ATP - Adenosine triphosphate
CEUA/BIO-UFPR - Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Paraná
CETP - Cholesterol ester transfer protein
ChREBP - Carbohydrate responsive element binding protein
COX-2 - Cyclooxygenase-2
CXCL-1 - CXC Motif Chemokine Ligand-1
DGAC - Dietary Guidelines Advisory Committee
DM2 – Diabetes Melitus tipo 2
DNA – Desoxyribonucleic acid
EPA - eicopentaenóico
EUA -Estados Unidos da América
HDL - High density lipoprotein
HPTA – Hydroxyl pentacyclic triterpene acids
IDL - Intermediary density lipoprotein
LCAT - Lecitina-Colesterol Aciltransferase
LDL - low density lipoprotein
LDLR - Low Density Lipoprotein Receptor
LPL - Lipoprotein lipase
LPS - Lipolissacarídeos
LXR MTP - Microsomal triglyceride transfer protein
MUFA - Monounsaturated fatty acids
NF- κ B - Nuclear Factor Kappa B
PPARs – Peroxisome proliferator-activated receptor
PUFA - Polyunsaturated fatty acids
RNA – Ribonucleic acid
RXR - receptor X de retinóide
SM - Síndrome metabólica

SR-B1 - scavenger receptor class B type

SREBP-1c - Sterol regulatory element-binding protein-1

TG - Triglicéridos

TPM - Transcripts per million

VLDL - Very low density lipoprotein

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 DESENVOLVIMENTO	18
2.1 ALIMENTAÇÃO HUMANA.....	18
2.2 PADRÕES ALIMENTARES.....	21
2.3 IMPLICAÇÕES DA DIETA PARA O METABOLISMO.....	23
2.3.1 Metabolismo de lipídios.....	24
2.3.2 Metabolismo de carboidratos.....	29
2.3.3 Obesidade e inflamação.....	32
2.4 NUTRIGENÔMICA.....	33
2.5 AZEITE DE OLIVA.....	37
2.5.1 Azeite de Oliva e a Nutrigenômica.....	39
3 JUSTIFICATIVA	42
4 OBJETIVOS	43
4.1 OBJETIVO GERAL.....	43
4.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	43
5 METODOLOGIA	44
5.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	44
5.2 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	45
5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E PERFIL LIPÍDICO.....	48
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
6 RESULTADOS	51
6.1 ANÁLISES DO EFEITO DO CONSUMO DE AZEITE DE OLIVA SOBRE A EXPRESSÃO DOS GENES APOB, APOE E LIPC FRENTE AS DIETAS WESTERN E EASTERN.....	51
6.2 COMPARAÇÕES DAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS ENTRE OS GRUPOS.....	55
6.3 COMPARAÇÕES DO PESO FINAL, GANHO DE PESO E INGESTÃO ALIMENTAR ENTRE OS GRUPOS.....	58
6.4 ANÁLISES DA RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES APOB, APOE E LIPC E AS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS, PESO FINAL E DELTA PESO, E CONSUMO ALIMENTAR.....	60
7 DISCUSSÃO	62
8 CONCLUSÃO	66

REFERÊNCIAS	68
ANEXO	72
ANEXO 1: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (CEUA/BIO-UFPR).....	72
ANEXO 2: METODOLOGIA DESCRITIVA DOS PROCEDIMENTOS DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL.....	73
ANEXO 3: DESENHO DOS PRIMERS DOS GENES UTILIZADOS NESTE ESTUDO.....	78

1 INTRODUÇÃO

Os hábitos alimentares evoluem com o tempo, já que fatores como renda familiar, preços dos alimentos, preferências palatares, crenças e tradições culturais, bem como o ambiente geográfico e social, interagem de maneira complexa para moldar os padrões de consumo alimentar. Assim, os padrões alimentares diferem grandemente entre populações e até mesmo entre comunidades específicas, porém, é possível identificar de uma forma geral dois padrões contrastantes: o padrão alimentar ocidental e o oriental. Populações que seguem uma dieta essencialmente oriental consomem mais grãos integrais, legumes, verduras, frutas e peixes, enquanto populações de hábitos alimentares essencialmente ocidentais apresentam maior ingestão de carnes processadas, carne vermelha, manteiga, laticínios de alto teor de gordura e grãos refinados (ZHU et al., 2013).

A alimentação consiste em fator de risco modificável e importante na etiologia das doenças de origem metabólica (ROCHA et al., 2017), e isso se reflete em diferenças quanto a prevalência e características dessas doenças em diferentes populações. Japoneses, por exemplo, em geral apresentam longevidade e baixa prevalência de morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares (HTUN et al., 2017), enquanto em algumas populações europeias e norte-americanas o contrário é observado (ZHU et al., 2013). Nesse sentido, as dislipidemias, conjunto de distúrbios relacionados ao metabolismo dos lipídeos, mostra-se igualmente diferente entre essas populações, enquanto americanos apresentam níveis sempre baixos de lipoproteínas de alta densidade (HDL – *high density lipoprotein*), os japoneses têm os níveis da mesma lipoproteína aumentados, assim como outros asiáticos apresentam baixos níveis de triglicerídeos e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL- *low density lipoprotein*) (FRANK et al., 2014).

Na gênese dessas diferenças encontram-se genes, cujos produtos participam de vias metabólicas, que interagem com os diferentes padrões dietéticos produzindo variação nos processos metabólicos que se refletem em variação fenotípica tanto em contextos patológicos quanto normais (FITÓ M.; KONSTANTINIDOU V.; 2016).

Dessa forma, as interações gene-dieta podem influenciar a expressão gênica diretamente ou indiretamente (FITÓ M.; KONSTANTINIDOU V.; 2016), e a área que se concentra a estudar essas interações e seus efeitos chama-se nutrigenômica. Dentro deste cenário nutrigenômico, estudos têm demonstrado os benefícios do

consumo de azeite de oliva extravirgem na redução dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, principalmente por meio da melhora do perfil lipídico, da resistência à insulina (PEDRET et al.,2018) e dos processos inflamatórios, além de influenciar positivamente nos estágios da carcinogênese. Grande parte desses benefícios ocasionados pelo consumo do azeite de oliva pode ser atribuído a sua elevada porcentagem de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) (KONSTANTINIDOU et al., 2010).

Segundo Konstantinidou e colaboradores (2010), o azeite de oliva tem efeito de proteção as partículas de LDL contra danos oxidativos, potencial efeito sobre o aumento da expressão do gene *APOE*, além da modulação de outros genes relacionado a processos infamatórios. Neste contexto, sabe-se que o produto do gene *APOE* está envolvido no catabolismo de lipoproteínas ricas em triglicerídeos (*APOE* apolipoprotein E [Homo sapiens (humano)] - Gene-NCBI, 2020), fazendo transporte na circulação sanguínea dos lipídios absorvidos no intestino delgado após o processo de hidrólise pelas lipases pancreáticas (MARANHÃO R. C., 2002).

Nesse sentido, outros genes cujos produtos possuem papel relevante no metabolismo lipídico podem apresentar interações nutrigenômicas. O gene *LIPC*, por exemplo, apresenta alta expressão nos tecidos adiposo e fígado (Portal GTex, 2020), e seu produto participa ativamente na quebra de moléculas de triglicerídeos que deixa remanescentes formando outras partículas menores como as lipoproteínas de baixa densidade ou de alta densidade (LIMA E. S.; COUTO E. D., 2006), e alta ingestão de fibras pode aumentar sua expressão. Já *APOB* apresenta como produtos os quilomícrons e lipoproteínas de baixa densidade (*APOB* Apolipoproteína B [Homo sapiens (human)] – Gene -NCBI, 2020), cujas funções são de transporte de lipídios da dieta pela circulação (AFONSO; SPICKETT, 2019) e transporte de triglicerídeos remanescentes, respectivamente (Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção a Aterosclerose, 2017).

Diante do exposto, esta pesquisa tem por objetivo investigar se o consumo de azeite de oliva extravirgem modula a expressão dos genes *APOE*, *APOB*, *LIPC* e os níveis de lipoproteínas do perfil lipídico e glicemia de modelos animais submetidos a dietas que reproduzem padrões ocidentais e orientais.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 ALIMENTAÇÃO HUMANA

A alimentação é essencial para identidade do ser humano, contribuindo para a diversidade, organização e hierarquia dos diversos grupos populacionais existentes. A relação humana com os alimentos é complexa e deriva da função biológica e nutricional dos alimentos, do comportamento cultural e da simbologia de cada alimento nas diversas populações (FISCHLER, 1988). Dessa forma, a culinária pode ser definida como um conjunto de regras culturalmente definido sobre práticas, produção, preparo e consumo de alimentos (LO MONACO; BONETTO, 2019).

O início da culinária e seu desenvolvimento estão ligados a invenção de utensílios, cocção ao fogo, cultivo da terra e animais e ao surgimento de núcleos habitacionais e comunidades aos arredores de campos de cereais, sendo, portanto, intimamente ligado ao início das civilizações. Na Grécia antiga, por exemplo, o modo de viver estava relacionado ao pensamento de que a saúde e boa forma eram derivadas de alimentação saudável e atividades físicas. Na Idade Média, problemas com o cultivo do trigo levaram a produção de outros cereais como aveia, milho e centeio. Durante a transição da Idade Média para a Idade Moderna, o povo europeu recebeu novas influências gastronômicas devido as expansões marítimas e mercantis, trazendo diferentes hábitos e práticas alimentares, como a incorporação das ervas do oriente no preparo de pratos, cultivo da batata, entre outros (SANTOS, 2007, não paginado).

Já no século XIX, a abundância de gorduras nas refeições levava a sociedade europeia a se destacar pela corpulência como indicativo de prosperidade e respeito, assim, nesta época, as pessoas buscavam desenvolver a obesidade e se manterem obesas. Logo adiante, no século XX, acentuadas mudanças nos hábitos alimentares ocorreram, principalmente nos Estados Unidos da América (EUA) e Inglaterra, trazendo a preferência por *fast food* e restaurantes por quilo (SANTOS, 2007, não paginado), contribuindo para a aquisição de hábitos alimentares não saudáveis nessas populações.

De forma geral, diferentes colonizações e interações entre as culturas, disponibilidade de alimentos, rumos históricos e particularidades culturais moldaram os diferentes hábitos alimentares que contribuem para a identidade e caracterização

dos diferentes grupos populacionais existentes hoje no planeta (SANTOS, 2007, não paginado). Nesse sentido, mesmo dentro de um país é possível encontrar padrões alimentares distintos, como é o caso do Brasil (MORATOYA et al., 2013). A variedade de climas e solos em nosso país levou a diversificação da oferta de alimentos em cada região e, por conseguinte, hábitos alimentares característicos. De raiz portuguesa, associada a culinária indígena e africana, a alimentação brasileira apresenta no Norte e Nordeste grande participação de pescados oriundos do mar ou rio, além do consumo de frutas propícias do clima tropical. Já na região Centro-Oeste a abundante vegetação e recursos hídricos são favoráveis a agricultura e pecuária, enquanto as regiões Sudeste e Sul têm seus hábitos alimentares pautados na herança de imigrantes Europeus, fartos no consumo de leites e derivados e carnes (Hábitos Alimentares no Brasil: conheça a cultura em cada região brasileira, 2018, não paginado).

No Brasil, temos o Guia Alimentar Para População Brasileira, que traz um conjunto de informações e orientações sobre a alimentação a fim de promover a boa saúde dos brasileiros como um todo. De forma geral, este guia enfatiza em 10 passos o que é necessário para uma alimentação saudável, como ingerir alimentos em sua forma natural ou minimamente processados, a redução da utilização de sal e açúcar ao preparar os temperos dos alimentos, evitar os ultraprocessados, alimentos frescos e de preparo em boas condições sanitárias (GUIA ALIMENTAR BRASILEIRO, 2014).

Ao analisar mundialmente os padrões alimentares das últimas quatro décadas, é possível caracterizar dois tipos gerais de dieta: a ocidental e a oriental (TOKUDOME et al., 2004). Apesar de ambas apresentarem percentuais semelhantes no que diz respeito a quantidade de energia proveniente de cada macronutriente principal (carboidrato, proteína, gordura), essas dietas diferem drasticamente quanto as fontes desses macronutrientes. A dieta de países ocidentais é, em geral, rica em açúcares refinados, proteínas e gorduras de origem animal (POPKIN, 2001), já nas populações orientais a principal fonte de gordura provém dos óleos vegetais (DREWNOWSKI; POPKIN, 1997), os carboidratos são em maioria complexos e a fonte proteica provém de carnes brancas e leguminosas (HU, F. B., 2002).

De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, a maioria dos habitantes da Ásia e dos países africanos seguem uma dieta oriental, enquanto os habitantes da Europa e da América do norte aderem a uma dieta ocidental (ZHU et al., 2013).

Na América do Norte, região em que se localizam os Estados Unidos da América e o Canadá, a gastronomia é marcada pelo grande consumo de *fast foods*, sanduíches, frituras e comidas industrializadas e congeladas. O café da manhã é composto de ovos fritos, bacon, pão, manteigas, geleias, sucos e chás (SANTOS D. M., 2018).

A cultura de alimentação rápida vem de um período após a Primeira Guerra Mundial, pois houve racionalização de alimentos e foi aí que os materiais de cozinha se aperfeiçoaram, o gás e a eletricidade passaram a exercer importante papel junto a culinária. Este foi o momento oportuno para expansão dos EUA em refeições rápidas, sanduíches, pizzas, salgados, refrigerantes, entre outros. A partir de então os *fast food* se alastraram pelo mundo (SANTOS D.M., 2018).

Durante os anos de 1600 a 1868, o Japão passou por um período difícil, fechamento de portos e escassez de matérias primas e as atividades produtivas do país eram exercidas por camponeses, artesões e mercadores muito simples. Nesta época, o arroz era alimento para os mais abastados enquanto a classe mais pobre se alimentava de outros cereais e tubérculos. Após este período, o Japão se firmou e fortaleceu seu povo, porém a Segunda Guerra Mundial trouxe mais um momento de carência alimentar. Findada a guerra, o país novamente se reestruturou e seguiu a mesma cultura alimentar fixada no consumo de arroz, soja, fontes proteicas animais e muitas verduras para tirar o povo da desnutrição deixada pela Guerra (MIDORI I.; 1986).

Assim a cozinha oriental se tornou uma das mais diferentes da Ásia por ser desenvolvida com pequena influência externa. No Japão, principal representante da dieta oriental, a culinária transmite cultura milenar e baseia-se em alimentos frescos, em especial os peixes crus e os temperos e complementos devem ser usados com delicadeza, a fim de manter o sabor original dos ingredientes principais (SANTOS D.M., 2018). Os alimentos básicos (arroz) sempre têm acompanhamentos como preparados de verduras cozidas em shoyu, conserva de vegetais e sopa de misso, além de soja e seus derivados, peixes e algas marinhas e raramente a utilização de ovos, leites e óleos (MIDORI I.; 1986).

Além dos aspectos culturais, históricos e econômicos atrelados aos diferentes padrões alimentares, aspectos relacionados a saúde dos indivíduos também emergem dessas complexas relações. Muita atenção vem sendo dada para a forma de se alimentar, tanto a qualidade quanto quantidade, bem como para a interação

nutriente x perfil genético dos indivíduos. Esta interação gera diversidade nas respostas metabólicas e nos perfis de risco a doenças, porém, é ainda pouco estudada e compreendida, sendo explorada no campo de estudo da nutrigenômica e nutrigenética (REDDY et. al., 2018).

2.2 PADRÕES ALIMENTARES

A história da alimentação acompanha a evolução da humanidade em suas práticas e hábitos alimentares, culminando na moderna obsessão do consumo de lanches e refeições processadas. Historicamente falando, a introdução desse perfil alimentar se consolidou em um cenário de necessidade de produtos industrializados ditados por grandes corporações que tinham como principal objetivo o lucro. No Brasil, na época do presidente Juscelino Kubitscek as empresas estrangeiras ganharam benefícios para se instalarem no país, dessa forma, as áreas de transporte e energia foram priorizadas, possibilitando a integração do território, permitindo o fluxo comercial de produtos industrializados. Neste cenário, a inserção marcante do capitalismo Norte Americano trouxe grande influência para a sociedade e cultura brasileira, trazendo o estilo de vida americano, como falar, se vestir e comer. Assim, essa prática de cozinha rápida trouxe a individualização, a economia de tempo e a desestruturação das práticas alimentares tradicionais (DANSKI M.T.R., 2008).

Por outro lado, uma nova forma de ver os alimentos têm se destacado na atualidade. Alimentos com propriedades funcionais, promovendo benefícios ao organismo, como a melhora do sistema imunológico, melhor condições físicas e mentais, retardo do processo de envelhecimento e boa saúde são chamados de alimentos funcionais. Tais alimentos se tornam importantes para garantir a manutenção da saúde, promovendo efeito hipocolesterolemiantes, hipotensivos, hiperglicêmicos, além de prevenir riscos a doenças cardiovasculares. O que torna estes alimentos tão importantes são os compostos bioativos presentes naturalmente neles, que podem ser definidos como nutrientes com ação metabólica ou fisiológica específica (FIGUEIREDO H. R.; CARVALHO V R.; 2015).

Dentre os compostos bioativos identificados que agregam funcionalidade aos alimentos podemos citar as fibras, polifenóis, carotenóides, tocoferóis, isoflavonas, ácidos graxos, probióticos, entre outros. Estas substâncias podem exercer seus efeitos atuando como antioxidantes, ativadores de enzimas, bloqueador de toxinas,

inibição da absorção de colesterol, redução da agregação plaquetária, podendo atuar de forma simultânea em diferentes alvos potencializando os benefícios fisiológicos para a saúde (FIGUEIREDO H. R.; CARVALHO V R.; 20).

A alimentação influencia diretamente os aspectos relacionados a saúde, porém os efeitos e a forma como essa relação se dá é diferente nos grupos populacionais, subgrupos específicos e indivíduos (REDDY et al., 2018). Claramente as dietas e padrões alimentares vêm mudando ao longo das décadas, principalmente nos Estados Unidos da América (POPKIN et al., 2012), acompanhando as mudanças demográficas associadas a expectativa de vida e fertilidade, juntamente com a transição epidemiológica associada a padrões de doenças (DREWNOWSKI; POPKIN, 1997). O estilo norte americano de alimentação, marcado por *fast food* e grandes porções de alimentos calóricos, ricos em sódio, (ODEGAARD et al., 2012) trazem refeições constituídas em grande parte por produtos de alto teor de gordura, frituras, grãos refinados, sobremesas com elevados níveis de açúcares, laticínios e carnes processadas, além de bebidas alcoólicas e baixa ingestão de frutas, vegetais, alimentos integrais e peixes, que podem oferecer riscos à saúde, implicando em males como diabetes tipo 2 (DM2), obesidade, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e câncer (ZHANG, 2015).

O *Dietary Guidelines Advisory Committee* (DGAC), já em 2015, recomendou à população norte-americana a substituição de grãos refinados por grãos integrais (GAESSER, 2015), redução de amidos, açúcares e carnes e aumentar a ingestão de frutas, vegetais, nozes, iogurtes, peixes e o óleos vegetais, pois assim reduziria o risco de desenvolvimento de Diabetes Mellitus tipo 2 e obesidade (MOZAFFARIAN, 2016).

Já os japoneses possuem em geral uma dieta mais rica em frutas, vegetais, peixes e grãos inteiros, elementos favoráveis a redução do risco de doenças cardiovasculares e outras doenças de origem metabólica (HTUN et al., 2017). Os benefícios, potencialmente provenientes do padrão alimentar oriental, mantem o Japão como uma das nações com maior expectativa de vida. Além disso, o costume de comer uma grande variedade de alimentos em pequenas porções, associados ao método de cozimento e a grande quantidade de água, promove a saciedade e a incorporação de compostos bioativos dos vegetais evitando excessos. O consumo de peixes, fontes de proteínas de alta qualidade, bem como decosaheptaenóico (DHA) e ácido eicopentaenóico (EPA), ácidos ômega-3 e alimentos à base de soja como o

misso e tofu são comuns na dieta japonesa, promovendo a redução da pressão arterial e glicose plasmática, sendo benéficos a saúde (GABRIEL et al., 2018).

Neste contexto, um grande estudo denominado *The Seven Countries Study* se baseou em comparações internacionais de comunidades para enfatizar abordagens nutricionais para prevenção de doenças cardíacas coronarianas através da substituição de gorduras saturadas por insaturadas, prevalecendo gorduras monoinsaturadas (MUFAs) e poli-insaturadas (PUFAs), assim, classificou a dieta mediterrânea como um modelo a seguir devido à alta ingestão de azeite de oliva, rico em MUFA (VISOLI et al., 2018).

2.3 IMPLICAÇÕES DA DIETA PARA O METABOLISMO

As doenças crônicas não transmissíveis de origem metabólica, como diabetes, obesidade e dislipidemias têm aumentado exponencialmente em todo o mundo, resultando na tendência do aumento da mortalidade. A predisposição genética, associada a fatores ambientais determina o desenvolvimento dessas condições, sendo que neste cenário de elevados casos dessas doenças, a dieta provavelmente representa um dos fatores mais relevantes (DE SANTIS et al., 2019).

A ingestão de gorduras na dieta determina a composição de ácidos graxos nas membranas celulares além de desempenhar papel importante no risco cardiovascular e síndrome metabólica por dar início a uma das vias do metabolismo de lipídeos (LOTTENBRTG A. M. P., 2009). O metabolismo energético em uma situação de sobrecarga se torna alterado, desencadeando doenças como a obesidade, alteração nos níveis e funcionamento dos lipídios e lipoproteínas, aumento da pressão arterial, desequilíbrio da homeostase da glicose-insulina, entre outros. Neste sentido, vale ressaltar que o excesso de nutrientes pode se apresentar como o aumento do tamanho e número de adipócitos, caracterizando o estado inflamatório denominado de inflamação metabólica ou metainflamação (FRANCISQUETI ET AL., 2015). Por outro lado, as dietas com alta porcentagem de ácidos graxos insaturados, por exemplo o azeite de oliva, têm sido associadas a um menor acúmulo de lipídeos hepáticos (PRIETO et al., 2018).

A longo prazo, a qualidade e o tipo de alimentos consumidos regulam vias relacionadas a lipogênese, função adipocitária e respostas glicose-insulina (MOZAFFARIAN, 2016), e a redução da ingestão calórica melhora vários parâmetros

como HDL (*high density lipoprotein*) e LDL (*low density lipoprotein*), TG (triglicerídeos), resistência à insulina e controle da glicose (ANDERSON et al., 2019). Portanto a compreensão em nível bioquímico e molecular da absorção e metabolismo de compostos bioativos é necessária para entender a relação causa/efeito, assim como a maioria destes compostos estão envolvidos no metabolismo energético, suas necessidades também são afetadas pela composição corporal e pela taxa metabólica basal, o que aumenta a complexidade dessa relação (REDDY et al., 2018).

2.3.1 Metabolismo de lipídios

Os lipídios são um grupo heterogêneo de moléculas que compartilham algumas propriedades em comum, sendo as principais o caráter hidrofóbico e a solubilidade em solventes orgânicos. Podem variar de estruturas simples de hidrocarbonetos até moléculas mais complexas como triglicerídeos, fosfolipídios, esteróis e ésteres de lipídios (BURDGE; CALDER, 2015).

Do ponto de vista fisiológico, os lipídios mais importantes são os fosfolípidos, o colesterol, os triglicerídeos e os ácidos graxos (AG), onde os fosfolípidos formam a estrutura básica das membranas celulares, o colesterol sendo precursor de hormônios esteroides, ácidos biliares e vitamina D (Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção a Aterosclerose, 2017). Os triglicerídeos representam cerca de 98% da gordura proveniente dos alimentos e servem de reserva energética para o organismo, se encontram na forma de uma molécula de glicerol e três de ácidos graxos (LOTTENBERG, 2009). Os ácidos graxos podem ser classificados em saturados ou insaturados, sendo os saturados, geralmente sólidos à temperatura ambiente e encontrados principalmente em alimentos de origem animal e em alguns vegetais (GADELHA, 2011), como os ácidos láurico, palmítico e o esteárico (SOUZA et al., 1998). Já os ácidos graxos insaturados se apresentam em duas variáveis: monoinsaturados e poli-insaturados (SOUZA et al., 1998). A classe de insaturados apresenta-se líquida à temperatura ambiente, conhecida como os óleos vegetais (GADELHA, 2011) oleico, linoleico e linolênico (SOUZA et al., 1998). A exemplo, o azeite de oliva, óleo de canola, abacate, nozes e amêndoas são ótimas fontes de ácidos graxos monoinsaturados. Os poli-insaturados são encontrados na família dos AGs ômega 3 e ômega 6 (GADELHA, 2011).

Os triglicerídeos ingeridos na dieta são parcialmente hidrolisados pelas lipases gástricas, intestinal e pancreática, gerando os ácidos graxos e monoglicerídeos, absorvidos nas microvilosidades intestinais, formando remanescentes de triglicerídeos. Após a absorção pelas células intestinais esses remanescentes de triglicerídeos são incorporados a moléculas de colesterol em vesículas de fosfolípidios, chamadas de quilomícrons (LOTTENBERG, 2009).

Os quilomícrons são responsáveis pelo transporte de lipídios (da dieta) do intestino para os tecidos metabolizadores de lipídios, musculares e adiposo e levam os lipídios restantes ao fígado. VLDL (*very low density lipoprotein*), IDL (*intermediary density lipoprotein*) e LDL (*low density lipoprotein*) estão envolvidos na segunda fase de entrega dos TG e colesterol do fígado aos tecidos periféricos (AFONSO; SPICKETT, 2019).

As VLDL são secretadas pelo fígado e sua montagem requer a ação da proteína intracelular TG microsomal (MTP - *microsomal triglyceride transfer protein*) responsável pela transferência dos TG para ApoB, permitindo a formação da Apolipoproteína. Depois de secretadas no sangue, assim como os quilomícrons, as VLDLs são hidrolisadas pela LPL (*lipoprotein lipase*), então os AG são liberados para os tecidos. Por ação da LPL as VLDLs são desvinculadas de TG e transformam-se em remanescentes, removidas pelo fígado, sendo que parte delas dá origem as IDLs. Durante a hidrólise de VLDL pode ocorrer trocas lipídicas com HDL (*high density lipoprotein*) e LDL por intermédio da ação da Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol (CETP - *cholesterol ester transfer protein*) (Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção a Aterosclerose, 2017).

As LDLs possuem apenas conteúdo residual de TG e são constituídas principalmente de colesterol. São capturadas por células hepáticas através de receptores específicos (LDLR - *Low Density Lipoprotein Receptor*) e dentro dessas células o colesterol livre pode ser esterificado por ação da enzima Acil-CoA:Coestril Aciltransferase (ACAT). A expressão desses receptores é a principal responsável pelo nível de colesterol circulante no plasma (Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção a Aterosclerose, 2017).

As partículas de HDL formadas no fígado, intestino e circulação, tem seu principal conteúdo as proteínas ApoA1 e AII. O colesterol livre das HDLs é esterificado por ação da Lecitina-Colesterol Aciltransferase (LCAT) sendo fundamental para a estabilização e transporte do plasma até o fígado, a qual é captada por receptores

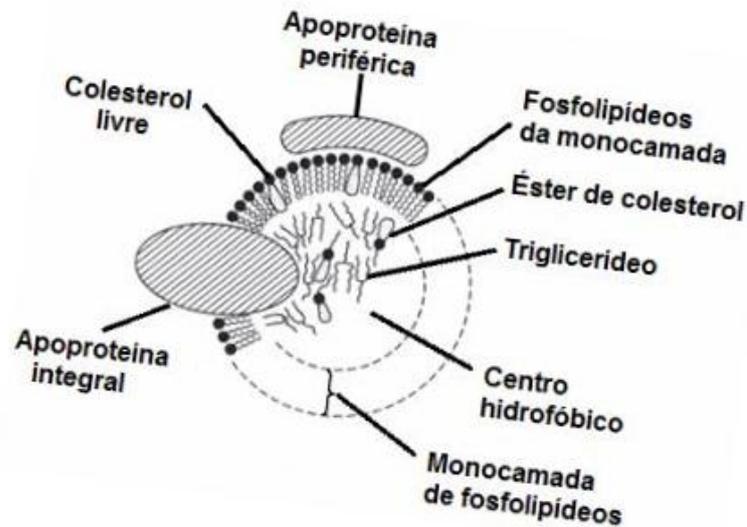
SR-B1 (*scavenger receptor class B type 1*). Com função de remoção de lípidos oxidados pela LDL, inibição da fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio as HDLs representam importante papel na proteção contra a aterosclerose (Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção a Aterosclerose, 2017).

Depois de serem transportados e solubilizados, para serem utilizados como geradores de energia, os lipídios devem ser mobilizados por influência de sinais hormonais como epinefrina, glucagon e ACTH que ativam as lipases, liberando AG livres e glicerol e o fígado os utiliza para a produção de TG (SANTOS, 2011).

Através das lipoproteínas é possível a solubilização e transporte desses lípidos no meio aquoso plasmático carregando em seu núcleo hidrofóbico triglicerídeos e ésteres de colesterol (MORITA, 2016). A fração proteica das lipoproteínas divide-se em cinco classes denominadas Apolipoproteínas, são elas: Apo A, B, C, D e E (GADELHA, 2011). Com diversas funções no metabolismo, elas exercem papel na formação intracelular de partículas lipoproteicas, atuam como ligantes a receptores de membrana ou ainda atuam como cofatores enzimáticos (Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção a Aterosclerose, 2017).

A estrutura de cada lipoproteína divide-se em parte proteica, localizada na superfície da molécula (apoproteína periférica) juntamente com outra introduzida na matriz lipídica (apoproteína integral) e a fração lipídica, constituída de lipídios apolares no núcleo da lipoproteína (ésteres de colesterol e triglicerídeos), ficando os lipídios mais solúveis posicionados mais externamente (colesterol livre e fosfolipídios) (GADELHA, 2011), como demonstrado na figura 1.

FIGURA 1: ESTRUTURA LIPOPROTEICA

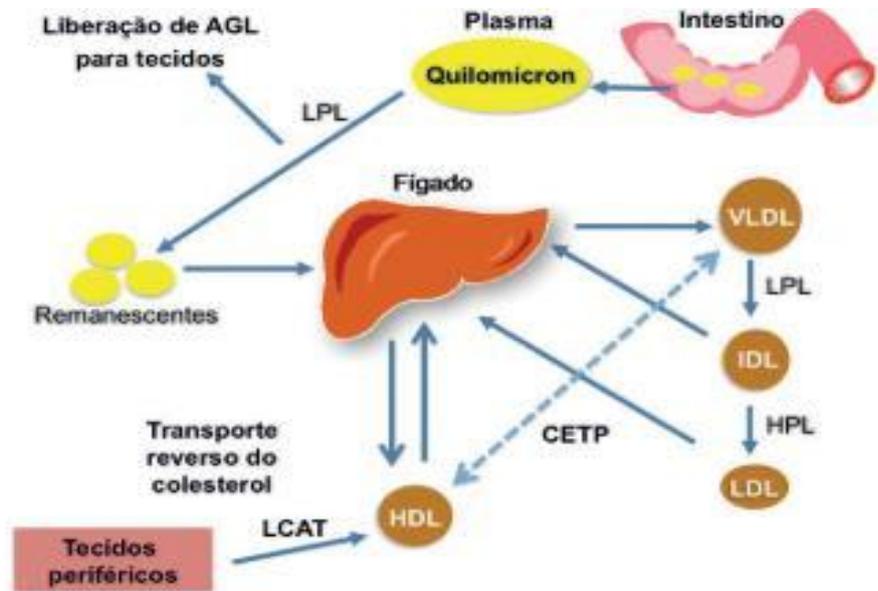


Fonte: Bioquímica Estrutural, 2011

Classificadas de acordo com a densidade (lipídio/proteína) e mobilidade eletroforética, as lipoproteínas (GADELHA, 2011) se distinguem em dois grandes grupos principais: a) as ricas em TG, maiores e menos densas, representadas pelos quilomícrons de origem intestinal, e pelas VLDL lipoproteínas de densidade muito baixa VLDL de origem hepática, e b) as ricas em colesterol constituídas pelas LDL e as HDL. Além destas, existe a lipoproteína de densidade intermediária (IDL) (Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção a Aterosclerose, 2017).

O circuito de transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado é denominado transporte reverso do colesterol (mostrado na figura 2), apresentando ação importante do complexo *ATP-Binding Cassete A1* (ABC-A1) que facilita a extração do colesterol das células pelas HDLs (Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção a Aterosclerose, 2017).

FIGURA 2: CICLOS DE TRANSPORTE DE LÍPIDES NO PLASMA



Legenda: Ciclos de transporte de lipídios no plasma. Três ciclos básicos de transporte de lipídios no plasma: (1) ciclo exógeno, no qual as gorduras são absorvidas no intestino e chegam ao plasma, sob a forma de quilomícrons, e, após degradação pela lipase lipoproteica (LPL), ao fígado ou a tecidos periféricos; (2) ciclo endógeno, em que as gorduras do fígado se direcionam aos tecidos periféricos; a lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) é secretada pelo fígado e, por ação da LPL, transforma-se em lipoproteína de densidade intermediária e, posteriormente, em LDL; (3) transporte reverso do colesterol, em que as gorduras, principalmente o colesterol dos tecidos, retorna para o fígado; as HDL nascentes captam colesterol não esterificado dos tecidos periféricos pela ação da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), formando as HDL maduras; por meio da CETP, ocorre também a transferência de ésteres de colesterol da HDL para outras lipoproteínas, como as VLDL.

Fonte: Adaptado de Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção a Aterosclerose, 2017

A variação dos níveis lipídicos e a síntese de proteínas e enzimas relacionadas ao metabolismo de lipídios é de característica multifatorial (ANDRADE; HUTZ, 2002), no entanto a Hipercolesterolemia Familiar (HF), é uma doença monogênica de herança autossômica dominante, sendo caracterizada pela elevação do colesterol total e do LDL. O defeito mais frequente na HF é uma mutação no gene específico *LDLR* e pode ser causada por mutações em qualquer um dos genes desta via como nos genes *ApoB* e da *PCSK9* (Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção a Aterosclerose, 2017). Segundo Andrade e Hutz (2002), podem influenciar os níveis de TG séricos, como a expressão do gene *APOE* que codifica apoproteína de quilomícron que se liga a receptores específicos do fígado e células

periféricas sendo essenciais ao catabolismo de lipoproteínas ricas em TG (*APOE* apolipoprotein E [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI); o gene *APOB* sendo o principal produtor das apolipoproteínas de quilomícrons e LDLs (*APOB* lipoprotein B [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI), entre outros importantes como *LIPC* envolvido na hidrólise de TG no fígado (*LIPC* [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI).

Assim, a interação entre fatores genéticos e ambientais determina o fenótipo do perfil lipídico. Alterações nesse perfil dão origem as dislipidemias, conhecidas pelas alterações dos níveis séricos de lipídeos e representa fator determinante para eventos cardiovasculares e cerebrovasculares, tais como aterosclerose, infarto agudo do coração, doença isquêmica do coração e derrame (IZAR et al., 2011).

As dislipidemias podem ser classificadas de acordo com níveis séricos de lipoproteínas, sendo hiperlipidemias ou hipolipidemias e podem ter causas primárias ou secundárias. As dislipidemias de causas primárias são aquelas nas quais o distúrbio lipídico é de origem genética, enquanto as de causas secundárias são decorrentes do estilo de vida inadequado, de certas condições mórbidas ou ainda do uso de alguns medicamentos. Podem ainda ser classificadas de acordo com a lipoproteína em anormalidade, como a hipercolesterolemia isolada: LDL-c ≥ 160 mg/gl; hipertrigliceridemia isolada: TG ≥ 150 mg/dl; hiperlipidemia mista: LDL-c ≥ 160 mg/dL e TG ≥ 150 mg/dL; e HDL-c baixo: < 40 mg/dl em homens e < 50 mg/dL em mulheres (Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção a Aterosclerose, 2017).

Dentro deste contexto dislipidêmico é possível notar diferenças nos padrões de lipoproteínas entre populações específicas, na Ásia por exemplo, os chineses apresentam níveis mais baixos de LDL e TG enquanto os japoneses têm níveis elevados de HDL, o que pode ajudar a explicar o menor risco de eventos cardiovasculares nestas populações. Em contrapartida, os brancos não hispânicos dos EUA com histórico de doença cardiovascular mostraram índices de HDL constantemente baixos (FRANK et al., 2014). Essas diferenças podem ser o resultado de fatores genéticos e ambientais, sendo a dieta ponto crucial para o desenvolvimento das dislipidemias secundárias (KAETHIKEYAN et al., 2009).

2.3.2 Metabolismo de carboidratos

Alimentos ricos em carboidratos constituem a metade ou mais de todas as calorias presentes na dieta e a qualidade desses alimentos está ligada com a saúde

cardiometabólica (MOZAFFARIAN, 2016). Vários alimentos que são fontes de carboidratos podem ser considerados protetores contra risco de desenvolvimento de algumas comorbidades por serem minimamente processados. São eles frutas, legumes, vegetais, grãos integrais, enquanto aqueles ricos em grãos refinados como pão branco, biscoitos, cereais, sobremesas e açúcares são prejudiciais. Altas doses desses açúcares prejudiciais são rapidamente digeridas no organismo e levam a hiperglicemia pós-prandial e hiperinsulinemia. No entanto, altas doses de frutose (açúcar das frutas) digeridas rapidamente têm pouca influência sobre os níveis de glicose e insulina no sangue, porém estimulam diretamente a lipogênese hepática *de novo* (MOZAFFARIAN D., 2016). Esse processo ocorre quando o excesso de glicose da dieta é capaz de estimular a secreção de insulina e a insulina estimula a lipogênese em três maneiras diferentes: iniciando a ação da enzima acetil-CoA carboxilase responsável pela formação de malonil-CoA a partir de acetil-CoA; atua favorecendo a desfosforilação da enzima piruvato desidrogenase e por último, provocando o aumento na atividade da enzima acetil-CoA carboxilase. Todas com a finalidade de converter a glicose em energia (BASTOS V. A. A.; 2012).

Os carboidratos são biomoléculas que fornecem energia às células (JUNIOR, 2008) além de reconhecimento e sinalização celular (POMIN; MOURÃO, 2006), sendo o fígado principal local de metabolismos dos carboidratos (glicólise e síntese de glicogênio) (WESTIN et al., 2007). Conhecido também por açúcar, seu nome carboidrato advém dos hidratos de carbono oriundos da fórmula geral $(CH_2O)_n$ e são divididos em três principais classes de acordo com o número de ligações glicosídicas: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. O termo sacarídeo é derivado do grego *sakcharon* que significa açúcar, embora muitos não apresentem o sabor adocicado (JUNIOR, 2008).

Os monossacarídeos são açúcares simples, que podem ter até sete átomos de carbono, sendo os mais comuns a glicose, frutose e a galactose. Já os polissacarídeos são formados pela condensação de monossacarídeos ou de seus derivados oligossacarídeos (13 unidades de monossacarídeos), estes são encontrados em sua forma livre em frutas, vegetais e legumes (GIESE et al., 2011).

Os carboidratos provenientes da dieta são processados por várias glicosidases no trato digestivo e os monossacarídeos resultantes são transportados para os tecidos como energia, sendo a glicólise a principal via para desencadear ATP (*adenosine triphosphate*) (HAN et al., 2016). É importante considerar a base fisiológica

da classificação dos carboidratos, medida pelo índice glicêmico (IG) (MOHAN et al., 2018).

Quando os carboidratos estão em excesso no fígado, devido a hiperglicemia pós-prandial, são primeiramente convertidos em glicogênio (forma de armazenamento de glicose em animais) e após convertidos em ácidos graxos via lipogênese, usando acetil-CoA que é incorporado em VLDLs (HAN et al., 2016).

Geralmente o glicogênio armazenado é fundamental para manter a homeostase da glicose durante o período de jejum. Quando necessário, o hormônio glucagon inicia a cascata enzimática que libera glicose do glicogênio por meio da glicogenólise. Quando os níveis de glicose começam a diminuir uma nova via de metabolização chamada *de novo* faz a gliconeogênese para fornecer mais energia a outros tecidos (HAN et al., 2016).

Resumidamente, o processo de metabolização *de novo* ocorre no fígado, para a síntese de novos ácidos graxos a partir de precursores não lipídicos, como os carboidratos provenientes da dieta (HAN et al., 2016). Já gliconeogênese ocorre quando o organismo precisa fazer síntese de glicose para energia a partir de precursores não oriundos de carboidratos. Neste processo ocorrem muitas reações com a finalidade de oferecer energia ao organismo, no entanto a gliconeogênese gasta mais energia do que a própria glicólise. A glicólise é o mecanismo mais usual de produção de energia a partir da glicose com apenas duas fases, preparatória e compensação (NELSON, D. L., COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger, 2011. Pg. 529).

A glicólise também é regulada por um mecanismo transcricional que é ativado durante o processo de alimentação. Os fatores de transcrição *SREBP-1c* (*Sterol regulatory element binding protein-1*) e *ChREBP* (*Carbohydrate responsive element binding protein*) são responsáveis pela ativação transcricional, não apenas de genes das enzimas glicolíticas, mas também dos genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos (HAN et al., 2016).

Os níveis de glicemia, de acordo com as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, podem ser classificados da seguinte maneira: glicose em jejum <100mg/dL é considerada normal; níveis de 100 a <126 mg/dL em jejum refletem a uma tolerância à glicose diminuída e níveis ≥126mg/dL em jejum são preditivos da ocorrência de Diabetes *mellitus* (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2015). Quando observados níveis de glicose repetidamente elevados em indivíduos com diabetes tipo

2 significa que podem diretamente relacionados ao sobrepeso, triglicerídeos altos, hipertensão, sedentarismo e hábitos alimentares não saudáveis. A gordura visceral também é indicativa de risco para DM2. Uma vez que, esse tecido produz citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa [TNF- α] e a interleucina-6 exacerba a resistência à insulina (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2015), somado a outros fatores e sintomas como hipertensão arterial e dislipidemias faz-se necessário o diagnóstico precoce e acompanhamento do quadro (Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção a Aterosclerose, 2017).

2.3.3 Obesidade e inflamação

Os riscos à saúde devido a obesidade surgem de sua ligação com outras patologias como hipertensão, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, doença hepática e alguns tipos de câncer. A inflamação crônica é um fenótipo associado a obesidade e contribui para a progressão das outras doenças já citadas (KOLB et al., 2017).

A obesidade pode ser definida pelo índice massa corporal (IMC) maior ou igual a 30 e devido ao estilo de vida ela tem se tornado um problema crescente de saúde pública no mundo, principalmente nos países ocidentais (KOLB et al., 2017), sendo caracterizada como pandemia da obesidade (FRANCISQUETI et al., 2015).

A inflamação associada a obesidade é desencadeada pelo excesso de nutrientes e principalmente localizada nos tecidos metabólicos especializados, como tecidos adiposo branco composto essencialmente por adipócitos. Os adipócitos por sua vez são células especializadas no armazenamento de energia na forma de triglicerídeos em gotículas de lipídeos citoplasmáticos, além da função de secreção de citocinas, hormônios e fatores de crescimento (KOLB et al., 2017).

O excesso de nutrientes leva a ativação de vias de sinalização metabólicas e a baixa indução dos níveis de citocinas inflamatórias, levando a uma resposta inflamatória de baixo grau, além da hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos e aumento dos ácidos graxo livres. Embora a inflamação associada a obesidade esteja principalmente localizada no tecido adiposo branco, outros tecidos mostram a presença de inflamação na obesidade, como o fígado o pâncreas e o cérebro (KOLB et al., 2017).

Diferentes fatores podem desencadear a resposta inflamatória no tecido adiposo em condições de sobrecarga nutricional, são eles a micro-hipóxia, estresse do retículo endoplasmático além de um mecanismo dependente de ativação de receptor toll-like4 (TLR4) na presença de ácidos graxos saturados. A hipertrofia dos adipócitos leva a ativação das vias de fatores de transcrição nuclear (NFκB), elevando a expressão de genes envolvidos na inflamação com maior liberação de citocinas e recrutamento de macrófagos. Acredita-se que os ácidos graxos saturados podem ativar TLR4 e esse mecanismo de ativação tem sido um fator de ligação entre a inflamação e a resistência à insulina em condições de obesidade e a sobrecarga nutricional (FRANCISQUETI et al.,2015).

2.4 NUTRIGENÔMICA

Conhecidas como a ciência da Genômica Nutricional (FARHUD; YEGANESH, 2010), a nutrigenética aponta para a compreensão de como a *background* genético de um indivíduo afeta os efeitos de uma dieta, enquanto a nutrigenômica estuda o papel dos nutrientes e compostos bioativos dos alimentos na modulação da expressão gênica (FENECH et al., 2011).

Deste modo, existem três fatores primordiais que regem essas duas áreas: i) diversidade existente no genoma herdado entre grupos populacionais o que afeta a biodisponibilidade e metabolismo dos nutrientes; ii) cada indivíduo difere na disponibilidade e escolha dos alimentos, dependendo das diferenças culturais, econômicas, geográficas e palatares e iii) a nutrição (em excesso ou déficit) pode afetar a estabilidade do genoma, levando a marcações no DNA que podem causar expressões gênicas anormais. A metilação do DNA (marcações com radical metila - CH₃) ocorre predominantemente em ilhas CpG e em regiões de sequência genômica. Esse acontecimento reprime a transcrição diretamente ao inibir a ligação de fatores de transcrição específicos e indiretamente ao recrutar proteínas de ligação metil-CpG que remodelam a cromatina em um estado inativo. As histonas sofrem modificações pós-traducionais que alteram sua interação com o DNA e proteínas nucleares. Essas modificações influenciam a expressão gênica, reparo de DNA e condensação cromossômica. Neste contexto, a epigenética se refere aos processos que regulam como e quando certos genes são ativados e desativados através da metilação, enquanto a epigenômica se refere à análise de mudanças epigenéticas em uma célula

ou organismo inteiro. A dieta por si só ou pela interação com outros fatores ambientais pode causar alterações epigenéticas que podem ativar ou desativar certos genes (FENECH et al., 2011).

Assim, através da nutrigenômica é possível compreender os efeitos de uma dieta na saúde e na doença, e para isso é necessário antes compreender de que forma se dá a interação nutriente – gene em nível molecular (MÜLLER; KERSTERN, 2003), incluindo alterações no epigenoma (metilação do DNA), expressão de RNA e micro-RNA (transcriptômica), expressão de proteínas (proteômica) e alterações no metabolismo (metabolômica) (FENECH et al., 2011).

Nesse contexto, podemos elencar alguns alimentos funcionais que podem fazer parte de uma dieta ou serem recomendados a fim de cumprir determinado efeito fisiológico. Em geral, alimentos funcionais incorporam compostos bioativos que podem proporcionar um benefício à saúde afora de seus nutrientes tradicionais (MOZAFFARIAN, 2016). Seus efeitos dependem de uma série de processos fisiológicos incluindo absorção, transporte, biotransformação, captação, ligação, armazenamento e excreção e mecanismos celulares de ação, como ligação a receptores nucleares ou fatores reguladores de transcrição (FENECH et al., 2011). Por exemplo, peixes oleosos, que contém altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados n-3 (n-3 significa que a primeira insaturação ocorre a partir do terceiro carbono), ou chá verde que possui altos níveis de catequinas além de outros alimentos de fácil acesso, que possuem componentes bioativos. Alguns exemplos estão descritos na tabela 1 (FERGUSON, 2009).

TABELA 1: EXEMPLOS DE ALIMENTOS FUNCIONAIS QUE CONTÊM COMPONENTES .

Classe de nutrientes	Classe de componentes bioativos	Atividades biológicas	Fontes alimentares (alimentos funcionais)
Lipídeos	Ácido graxo poli-insaturado n3	Anti-inflamatório, proteção contra o câncer e proteção cardiovascular	Peixes oleosos
	Polifenóis	Anti-inflamatório, redução do estresse oxidativo, proteção cardiovascular	Azeite de oliva extravirgem

Vitaminas	Folato	Função imunológica, proteção contra o câncer	Lentilhas, fígado, espinafre e chá verde
	Vitamina C	Antioxidantes, proteção contra o câncer	Frutas cítricas, kiwis
Minerais	Selênio	Antioxidantes, proteção contra o câncer	Carne de órgão, ovos e frutos do mar
	Zinco	Crescimento e desenvolvimento, função imune	Carne, frutos do mar e leite
Fitoquímicos	Carotenóides (alfa e beta caroteno, luteína, licopeno e zeaxantina)	Antioxidante, proteção contra o câncer, diminui o risco de degeneração macular	Frutos amarelos e vermelho-alaranjado
	Flavonoides (quercetina), Flavonas (apigenina) Flavonóis (catequinas),	Proteção contra o câncer e proteção o cardiovascular	Frutas, legumes, vinho tinto, chá verde, chocolate preto e cacau em pó
	Isoflavonas (genisteína)	Miméticos de estrogênio, podem proteger contra o câncer	Soja e alimentos à base de soja
Zooquímicos	Ácido linoleico conjugado	Redução de gordura e proteção contra o câncer	Carne vermelha e laticínios

Tabela adaptada de Nutrigenomics Approaches to Functional Foods, 2009.

De forma geral, os nutrientes modulam a expressão gênica através de fatores de transcrição. Em órgãos metabolicamente ativos (fígado, intestino, tecido adiposo), os fatores de transcrição atuam como sensores de nutrientes, alterando o nível de transcrição de DNA de genes específicos em respostas as alterações nutricionais (MÜLLER; KERSTERN, 2003).

Indivíduos que seguem um padrão alimentar ocidental, rico em gorduras, principalmente ácidos graxos saturados, mostram um perfil de expressão gênica relacionado à resposta inflamatória, intolerância à glicose, acúmulo de lipídios hepáticos e a sinalização do câncer em comparação aqueles com alimentação de características mais saudáveis (RAMOS- LOPEZ et al., 2017).

Neste sentido, dietas com características do padrão mediterrâneo reduzem a expressão pós-prandial de genes relacionados a inflamação, estresse do retículo

endoplasmático, aterogênese e estresse oxidativo, além disso, a alta ingestão de ácidos graxos monoinsaturados através do consumo de azeite de oliva tem sido associada a baixa expressão de genes envolvidos no armazenamento lipídico anormal (RAMOS- LOPEZ et al., 2017).

Outros compostos bioativos como ácidos graxos poli-insaturados regulam a expressão de genes neuropeptídicos envolvidos na homeostase energética, assim como dietas suplementadas com ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido α -lipóico têm sido associados a regulação positiva de genes oxidantes de ácidos graxos e a regulação negativa de genes lipogênicos e pró-inflamatórios (RAMOS- LOPEZ et al., 2017).

A família de receptores hormonais nucleares são fatores de transcrição pertencentes ao grupo mais importante de sensores de nutrientes, dentre eles estão presentes o ácido retinóico (receptor de ácido retinóico *RAR*) e receptor X de retinóide (*RXR*), receptores ativados por proliferados de peroxissomo (*PPARs* – *peroxisome proliferator-activated receptor*) e receptor X no fígado (*LXR*- *liver x-receptor*) (MÜLLER; KERSTERN, 2003).

Os receptores nucleares funcionam como fatores de transcrição ativados por ligantes, ligando-se a pequenas moléculas lipofílicas (GEORGIADI; KERSTEN; 2012). Ligam-se a sequências específicas de nucleotídeos (elementos de resposta) nas regiões promotoras dos genes e durante essa ligação os receptores nucleares sofrem alterações conformacionais que levam a dissociação coordenada de correpressores e recrutamento de proteínas coativadoras para a ativação transcricional (MÜLLER; KERSTERN, 2003).

Em meio aos nutrientes que regulam a expressão de genes relacionados a adipogênese estão os ácidos graxos, que podem exercer efeito através da regulação do *Nuclear Factor Kappa B* (NF- κ B) devido a diminuição da expressão de *PPAR γ* e o aumento da expressão da enzima lipase acelerando a mobilização de TG dos adipócitos. Já os carboidratos modulam expressões gênicas através do *ChREBP* que são direcionados pelo fígado via glicolítica (VALENTE, 2014) mediante altos níveis de glicose e serve como efetor da expressão lipogênica (FARHUD; YEGANESH, 2010)

Os ácidos graxos palmítico (16:0), oleico (18:1n9), linoleico (18:2n6) e ácido araquidônico (20:4n6) são ligantes de *PPAR γ* . Esses sensores lipídicos geralmente heterodimerizam com o receptor retinóide, e se ligam aos receptores nucleares influenciando a expressão gênica. Já as *SREBPs* são ativadas por clivagem de

proteases, evento regulado por níveis baixos de oxiestróis e alterações na insulina/glicose e por PUFAS (FARHUD; YEGANESH, 2010). Estudos anteriores demonstraram que a ingestão de azeite de oliva extravirgem teve associação com a regulação positiva de *RXR*s paralelamente a ativação da família *PPAR*s (DE SANTIS et al. 2019).

Nesse contexto, um alimento que tem sido investigado como bioativo é o azeite de oliva por apresentar propriedades protetoras à doenças cardiovasculares e outros distúrbios metabólicos devido a suas altas concentrações de ácidos graxos monoinsaturados e outros compostos fenólicos com características antioxidantes (DE SANTIS et al. 2019).

2.5 AZEITE DE OLIVA

O azeite de oliva, reconhecido como símbolo da dieta mediterrânea, apresenta duas variantes principais: azeite de oliva virgem e extravirgem (NOCELLA et al., 2017), a diferença está no teor de acidez de cada uma (LIMA et al., 2012). Sua classificação em termos de acidez é dada de acordo com quantidade de ácido por gramas de azeite, assim o azeite extravirgem possui uma acidez máxima de 0,8g de ácido por 100g de azeite, enquanto o azeite virgem tem a acidez livre de 2g por 100g de azeite e o azeite comum possui sua acidez não maior que 3,3% (NOCELLA et al., 2017). A qualidade e propriedades do azeite de oliva dependem de fatores como cultivo, origem geográfica, condições climáticas, técnicas agronômicas e processamento (DE SANTIS et al., 2019).

Obtido a partir de extração manual das azeitonas, o azeite de oliva é uma das principais fontes de gordura provenientes da dieta mediterrânea e promove boa saúde com efeitos que reduzem o risco de câncer, doenças neurodegenerativas, síndrome metabólica (SM) e eventos cardiovasculares (PIRODDI et al., 2016). Quando a extração do azeite é feita de modo manual, são preservados o conteúdo e concentração de componentes menores que são perdidos quando esse processo é refinado. Ao comparar o azeite extravirgem com o azeite refinado, este mostra mostra-se com efeito menos saudável devido ao baixo teor fenólico, apesar da semelhança na concentração de MUFA (DE SANTIS et al., 2019)

A *Olea europea* foi provavelmente uma das primeiras árvores que seguiram a rota das migrações das populações do mediterrâneo há cerca de 5500 anos (DE

SANTIS et al., 2019). As oliveiras têm enorme variabilidade genética e fenotípica e foi possível identificar aproximadamente 600 cultivares excluindo sinônimos e homônimos. Em geral, os azeites extravirgens oriundos da Grécia, Itália e Espanha possuem baixos níveis de ácidos linoleicos e ácidos palmíticos e são ricos em ácido oleico. Em especial a variedade *Salella* é rica em concentrações de ômega-6, que promove a redução de colesterol total e de LDL no sangue e cultivares do tipo *Chetoui* e *Blanqueta* são ricas em ácido linoleico e induzem maior incorporação de TG nas células THP-1 (linhagem de monócitos humano) conferindo efeitos cardioprotetores (DE SANTIS et al., 2019).

Evidências demonstraram efeitos do azeite de oliva no controle homeostático de genes envolvidos no metabolismo lipídico, imunoinflamatório, proteção de vasos sanguíneos e da pressão arterial, além da regulação metabólica. Desta forma, o azeite de oliva pode ser classificado como alimento funcional contendo vários bioativos como MUFAs, PUFAs, vitamina E, biofenóis, esqualeno, fitoesteróis, ácidos triterpênicos e dialcoóis e polifenóis (PIRODDI et al., 2016).

Os ácidos graxos monoinsaturados têm uma ligação dupla, sendo o mais comum o ácido oleico (C-18), mas também incluem carne vermelha, nozes, azeite de oliva e óleo de canola, dentre outros. Já os ácidos graxos poli-insaturados possuem duas ou mais duplas ligações e sua classificação varia com a posição da dupla ligação e se classificam de acordo com a localização desta ligação, chamados de n-6 ou n-3. O PUFA n-6 mais predominante é o ácido linoleico (C-18) encontrado em óleos de milho, girassol e soja, enquanto o n-3 principal é o ácido afa-linoleico (ALA), com três duplas ligações. O ALA é predominantemente encontrado em óleos de linhaça, soja e canola. Menores quantidade de n-3 estão presentes em frutos do mar como os ácidos graxos de cadeias muito longas com cinco ou mais duplas ligações, peixes como arenque, salmão, cavala e sardinha são ricos em nesse tipo de PUFA n-3 (TEMPLE N. J., 2018).

A gordura monoinsaturada melhora a pressão arterial e o colesterol quando consumida no lugar de gorduras saturadas, reduz níveis de glicose e a predisposição à resistência insulínica (MOZAFFARIAN D., 2016) enquanto os ácidos graxos poli-insaturados proporcionam um discreto efeito redutor sobre os triglicerídeos (SANTOS

et al., 2013), além de diminuir o LDL e aumentar HDL entre outros benefícios anti-inflamatórios (MOZAFARIAN D., 2016).

Estudos demonstraram que os benefícios do consumo de azeite oliva extravirgem são, além da presença de ácidos graxos monoinsaturados, devidos ao componente fenólico, hidroxitirosol. Os polifenóis são capazes de reduzir níveis plasmáticos de aminas cíclicas e de proteínas C-reativas, além de melhorar o metabolismo lipídico e função plaquetária, bem como a sensibilidade a insulina e níveis de glicose (DE SANTIS et al., 2019). Assim como os ácido Triterpeno hidroxil pentacíclico (*HPTA – Hydroxyl pentacyclic triterpene acids*) os dialcoóis estão relacionados a efeitos anti-inflamatórios, hepatoprotetores, anticâncer, antiviral, anti-HIV, antimicrobiano, antifúngico, antidiabético e gastroprotetor (PIRODDI et al., 2016).

2.5.1 Azeite de Oliva e a Nutrigenômica

Em uma subpopulação do estudo EUROLIVE, a administração de 25mL diários de azeite de oliva extravirgem por 5 semanas, no contexto da dieta clássica do mediterrâneo, reduziu a expressão de genes relacionados a inflamação (*IFN γ* e *IL-7R*), metabolismo lipídico (*AFHGAP15*), estresse oxidativo (*ADRB2*) e reparo do DNA (*POKL*) em comparação a dieta habitual dos participantes desse estudo (DE SANTIS et al., 2019).

Vias relacionadas ao metabolismo lipídico e inflamatório foram reguladas com o consumo pós-prandial de azeites virgem e extravirgem e detectou-se que tais modulações são totalmente atribuídas aos principais componentes dos azeites, os MUFAs e PUFAs e não a seus componentes menores, como os polifenóis. A estes, foi atribuído a regulação do metabolismo da glicose (DE SANTIS et al., 2019).

Em outro estudo foi possível identificar níveis plasmáticos mais baixos de lipolissacarídeos (LPS), menor ativação de NF-kB, redução das interleucinas 6, 1 β e *CXCL-1 (CXC Motif Chemokine Ligand-1)* em indivíduos com síndrome metabólica que ingeriram 30 mL de azeite de oliva rico em polifenol no café da manhã (DE SANTIS et al., 2019).

No estudo de Konstantinidou e colaboradores (2010) com adesão da dieta mediterrânea, rica em azeite de oliva, *in vivo* (ensaio clínico randomizado com homens e mulheres entre 20 e 50 anos) pôde-se observar o efeito nutrigenômico dos

componentes bioativos do azeite. Houve a diminuição da expressão de genes relacionados a processos inflamatórios (*IFN*, *ARHGAP15* E *IL7R*), estresse oxidativo (*ADRB2*) e danos ao DNA (*POLK*). Além destes, o azeite de oliva impediu o aumento da *cyclooxygenase-2* (*COX-2*) e expressão do gene relacionado ao receptor LDL (*LRP1*) (KONSTANTINIDOU et al., 2010).

Farràs e colaboradores (2013), também conduziram um estudo *in vivo* e, observaram que a ingestão de azeite de oliva extravirgem rico em conteúdo fenólico induziu o aumento da expressão dos genes *ABCA1*, *SRB1*, *PPARBP*, *PPAR α* , *PPAR γ* , *PPAR δ* e *CD36*, mostrando a forte correlação da ingestão desse tipo de azeite com genes da cascata de efluxo do colesterol além da diminuição de LDL oxidado. Essa regulação positiva dos genes pode estar relacionada com os ácidos graxos insaturados e polifenóis presentes no azeite (FARRÁS et al., 2013).

Nesse contexto, o gene *APOE* apresentou modulação da sua expressão induzida pelo consumo do azeite de oliva, refletindo na diminuição dos níveis de LDL e aumento dos níveis de HDL (PERRONE et al., 2019). A apoproteína do quilomícron codificada por *APOE* (apolipoprotein E), localizada no cromossomo 19 - 19q13.32 O gene *APOE* humano está localizado no braço longo do cromossomo 19 (19q13.2) estando próximo a outros genes, dentro do mesmo loco. O *APOE* é composto por quatro exons, distribuídos ao longo de 6.740 nucleotídeos no genoma humano. Retirando-se os introns, sobram apenas 1.156 pares de bases que compõem o mRNA que será transcrito, responsável pela tradução de três isoformas da proteína (OJOPI et al., 2004). Seu produto gênico liga-se a receptores específicos no fígado e é essencial para o catabolismo de lipoproteínas ricas em TG (*APOE* apolipoproteína E [Homo sapiens (human)] - Gene- NCBI, 2020). Tem sua expressão elevada no fígado, apresentando TPM (transcripts per milion) mediano de 3182, segundo dados do GTex.org. Além disto, apresenta expressão significativa de 430,4 TMP no tecido adiposo subcutâneo e de 262,7 TPM no tecido adiposo visceral, além de outros tecidos e tendo sua maior expressão na glândula adrenal (Portal GTex, 2020).

Assim como *APOE*, outros genes podem ser candidatos a atuarem em um contexto nutrigenômico. Dentre esses, o gene *APOB* (*apolipoprotein B*) codifica a principal Apolipoproteína dos quilomícrons e das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e é ligante do receptor LDL. *APOB* localiza-se n cromossomo 2 em humanos (2p24.1 com um total de 42.645 pares de base e doenças associadas diretamente a ele incluem Hipobetalipoproteinemia familiar1 e Hipercolesterolemia familiar 2 (*APOB*

gene-Protein Coding – GeneCards, 2021). Apresenta-se no plasma sob duas isoformas apoB-48 e apoB-100, sendo a apoB-48 sintetizada exclusivamente no intestino e apoB-100 no fígado (*APOB* apolipoproteína B [Homo sapiens (human)] – Gene -NCBI, 2020). Tendo alta expressão no fígado cerca de 347,1 TPM, um pouco menos no intestino, aproximadamente 36,71 TPM e próximo a zero nos tecidos adiposo subcutâneo (0,572 TPM) e visceral (0,696 TPM) (Portal GTex, 2020). Não foram encontrados estudos anteriores de associação nutrigenômica e o gene *APOB*.

O gene *LIPC* (*lipaseC, hepatic type*) codifica a enzima lipase hepática de triglicerídeos expressa no fígado (*LIPC* lipase C [Homo sapiens (human)] - Gene-NCBI, 2020), localizado no cromossomo 15 (15q21.3) e com o total de 159.388 pares de bases (*LIPC* gene-Protein Coding – GeneCards, 2021, apresentando um TPM de 26,80 para o fígado e de 0,2910 TPM para tecido adiposo subcutâneo e 0,132 TPM para adiposo visceral (Portal GTex, 2020). Ainda que pouco estudado, Martínez e colaboradores (2008) relatam a possível interação entre a ingestão de fibras alimentares e o aumento da expressão de *LIPC*, sendo importante na homeostase lipídica.

3 JUSTIFICATIVA

É possível estabelecer que alguns países - ocidentais, com tendências alimentares ricas em gorduras saturadas e carboidratos, têm apresentado maiores índices de doenças cardiovasculares, diabetes e dislipidemias, enquanto outros países – orientais, que possuem hábitos alimentares pautados em alimentos frescos e grãos integrais, são conhecidos pela longevidade e boa saúde de suas populações. Essa diferença na alimentação possivelmente contribui para que essas populações apresentem padrões desiguais de dislipidemias. Assim, hábitos alimentares em interação com genes específicos podem influenciar diretamente o perfil de saúde de uma população, porém essa relação ainda é pouco estudada.

A investigação da relação de um composto bioativo, fortemente presente na alimentação de populações saudáveis e de fácil acesso ao consumo diário, como o azeite de oliva, com a expressão de alguns genes-alvo aos níveis de lipoproteínas e glicose plasmática é de suma relevância para entender a dinâmica da nutrigenômica envolvida nessa interação. As possíveis modulações gênicas que ocorrem frente ao consumo do azeite de oliva extravirgem, especialmente em *LIPC*, quando em conjunto com dieta de consumo equilibrado induzem a melhora do perfil de triglicerídeos. Esse conhecimento pode levar a novas perspectivas de prevenção e controle das alterações dos níveis séricos das lipoproteínas e possivelmente da glicose nas populações que apresentam comorbidades relacionadas a esses parâmetros oriundas da alimentação.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se a suplementação dietética com azeite de oliva possui efeito modulador sobre a expressão de genes associados ao perfil lipídico e glicêmico em modelos animais submetidos a dietas com padrões alimentares ocidentais e orientais.

4.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Verificar se a suplementação com azeite de oliva é capaz de modular a expressão do gene *APOB*, associado em metanálise prévia com a variação do perfil lipídico de populações orientais, frente o consumo de dieta característica oriental e ocidental em modelo animal;
- Investigar os possíveis efeitos modulatórios do azeite de oliva na expressão dos genes *APOE* e *LIPC*, associados em metanálise prévia com a variação do perfil lipídico em ambas as populações ocidental e oriental, frente o consumo de suas respectivas dietas em modelo animal;
- Verificar se há relação entre os níveis de expressão gênica obtidos do tecido hepático e adiposo com o perfil lipídico e glicemia dos animais.
- Verificar se há relação entre os níveis de expressão gênica obtidos do tecido hepático e adiposo com o consumo médio e ganho de peso dos animais.

5 METODOLOGIA

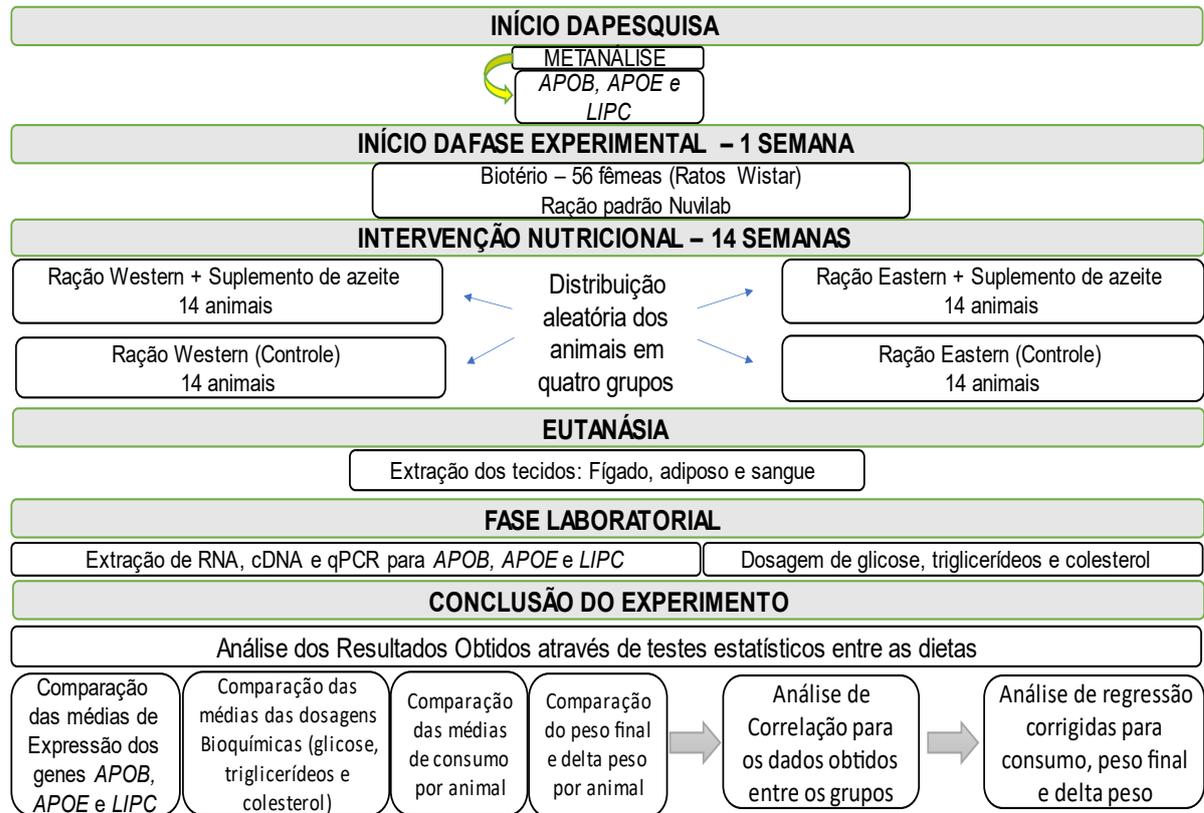
5.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

A pesquisa foi composta por duas etapas. A primeira etapa foi teórica, composta por uma revisão sistemática da literatura e metanálise, conduzida pela doutoranda Mayza Dalcin Teixeira, pertencente ao mesmo grupo de pesquisa, como parte de sua tese de doutorado. O objetivo dessa etapa teórica foi elencar os genes de maior importância para a variação dos níveis dos componentes do perfil lipídico e glicemia, em populações com hábitos essencialmente ocidentais e orientais. Como resultado da metanálise foram listados genes que apresentaram associação da expressão com os níveis de algumas lipoproteínas em populações com hábitos alimentares essencialmente orientais (Japão) e ocidentais (Estados Unidos da América). Nas amostras da população japonesa foi encontrada associação significativa entre os genes *LIPC*, *APOE*, *ABCA1*, *CETP*, *LPL*, *APOA5*, *APOB*, *APOC1*, *APOC3* e *ZPR1* e traços do perfil lipídico; e nas amostras da população dos EUA os genes *APOE*, *LIPC*, *LIPG*, *ZPR1*, *SORT1* e *CETP* se mostraram associados a variação do perfil lipídico.

Para a segunda etapa da pesquisa foram selecionados, a partir desse conjunto de genes elencados na metanálise, aqueles genes que apresentaram associação apenas em uma das duas populações e genes que foram associados em ambas as populações. Dessa forma, foram selecionados para a etapa experimental os genes *APOE* e *LIPC* (para ambas as populações); o gene *LIPG* (população ocidental) e o gene *APOB* (população oriental). Os genes selecionados apresentaram relação com a via metabólica conexa com o nosso estudo.

A segunda etapa foi experimental com modelo animal. O objetivo dessa etapa foi submeter o modelo animal (ratos) a dietas que reproduziram características orientais e ocidentais, suplementadas com azeite de oliva - ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), e verificar os padrões de expressão gênica resultantes. As etapas do delineamento da pesquisa estão apresentadas na Figura 3.

FIGURA 3: DELINEAMENTO ESQUEMÁTICO DA PESQUISA



Fonte: O autor (2021)

5.2 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Os experimentos foram realizados com modelo animal *Rattus norvegicus* (ratos da linhagem Wistar) e seguiram as normas previstas pela Lei n° 11.794 de outubro de 2008 entre outras normativas institucionais. Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO-UFPR) no dia 18/02/2020 -R.O. 01/2020, sob protocolo: 23075.082467/2019-18, os experimentos tiveram início em 31 de agosto de 2020, com duração de 15 semanas ao total.

Ao todo, 56 ratas (fêmeas) foram acomodadas em caixas plásticas no Biotério da UFPR, submetidas a 12h luz/escuro, com 60% de umidade, com livre acesso à água e comida. Todas as ratas foram aclimatadas a dieta padrão com ração Nuvilab uma semana. A ração de aclimação Nuvilab em sua composição apresentava a maior parte composta de 60% de carboidratos de origem complexa (milho e farelo de

trigo), 5% de lipídios (óleo de soja, milho, farelo de trigo e farelo de soja), 22% de proteínas (milho, farelo de trigo e soja) e 70g/Kg de fibras.

Após esse período, as 56 ratas foram distribuídas aleatoriamente para comporem 4 grupos, com 14 animais em cada grupo, sendo os grupos: dieta Western + suplementação de azeite de oliva extravirgem; somente dieta Western (controle); dieta Eastern + suplementação de azeite de oliva extravirgem e somente dieta Eastern (controle). Foram, ao total, 16 caixas plásticas, retangulares, brancas, fornecidas pelo biotério, forradas com maravalha e contentor de metal na parte superior. Aquelas com numeração de 01 a 08 continham 3 animais em cada, identificados com ácido pícrico (de coloração amarelada e sólido a temperatura ambiente, foi utilizado diluído em água e com a utilização de um pincel embebido na solução foi identificado na pelagem dos animais I, II, III ou III, o que se manteve durante todo o período de experimento) de 01 a 03, enquanto as caixas de números 09 a 16 continham 04 animais, também identificados de 01 a 04. Os animais das caixas 01, 02, 09 e 10 receberam a ração de padrão ocidental e suplementação de azeite de oliva extravirgem 03 vezes na semana (segunda, quarta e sexta), os animais das caixas 03 e 04; 11 e 12 receberam a ração de padrão oriental e suplementação com azeite de oliva extravirgem na mesma frequência que as caixas 01, 02, 09 e 10. As caixas 05, 06, 13 e 14 e 07, 08, 15 e 16 não receberam suplementação de azeite de oliva, receberam apenas a ração padrão ocidental e oriental respectivamente, servindo como grupos controle.

As rações especiais para as dietas foram produzidas pela Pragsoluções Biociências – Jaú/SP, seguindo padrões já descritos na literatura por Bortolin (2017) para dieta ocidental em roedores e Murakami (2017) para dieta oriental com adaptação para roedores. As especificações nutricionais constam na tabela 2.

TABELA 2: INFORMAÇÕES NUTRICIONAIS DAS DIETAS WESTERN E EASTERN.

	Dieta WESTERN (4,422Kcal/g)			Dieta EASTERN (4,194Kcal/g)		
	Energia	Fonte	kcal	Energia	Fonte	kcal
Carboidratos Simples	50%	50% trigo refinado e 50% sacarose	2126		*	
Carboidratos Complexos		*		56%	50% arroz integral e 50% milho	2359
Lipídios	34%	20% de óleo de soja e 80% de gordura animal (banha)	1582	27%	Óleo de soja e suplemento de óleo de peixe ¹	1175

Proteínas	16%	soja	715	16%	soja	661
Fibras	25g/kg			50g/kg		
Sódio (Na)	4,1g/kg			3g/kg		

Nota: ¹- Ômega 3 – distribuído por Essencial Nutrition, Liquid super ômega 3 foi incorporado à ração. A ração oriental teve a adição de 1% de óleo de peixe sobre o valor total de lipídeos (27%). Esse valor refere-se ao consumo diário de aproximadamente 700mg de ômega 3 observado em países do sudeste asiático, incluindo Japão e Coreia do Sul, que provém de frutos-do-mar e peixes.

* não faz parte desta ração.

Foram dadas aos grupos experimentais porções de ração correspondentes de cada dieta três vezes na semana e calculado o consumo médio diário de cada animal. No primeiro dia foi colocado 50g de ração por animal para dois dias em cada caixa, após os dois dias, foi pesado a sobra de ração e calculado o consumo por animal em cada dia. Então estabeleceu-se a quantidade de 25g por animal, por dia, a fim de que eles pudessem comer ad libitum. O Consumo médio por animal foi registrado, pesando a quantidade de ração fornecida para 02 dias e a sobra após esses 02 dias, calculando assim a média de consumo por animal dentro de cada caixa. Para os finais de semana era calculado o peso necessário de ração para 03 dias.

As suplementações com o azeite de oliva corresponderam em dosagens de 0,4mL, seguindo o estudo feito por Mohammadian e colaboradores (2018), três vezes na semana, totalizando 1,2mL por semana. Para a administração do azeite foi utilizada uma seringa de 0,5mL a fim de medir a quantidade e em seguida ser aplicada diretamente dentro da boca do animal. Os grupos controles receberam água na mesma dosagem e frequência que dos grupos que receberam a suplementação. O azeite utilizado foi produzido na Espanha, com as cepas Hojiblanca Picuda – Venta del Baron, colheita de 2019. Na escolha do azeite levou-se em consideração a confiabilidade de rastreamento da origem e das características em que foi produzido. As informações nutricionais do azeite estão na tabela 3.

TABELA 3: INFORMAÇÕES NUTRICIONAIS DO AZEITE DE OLIVA EXTRAVIRGEM – VENTA DEL BARON POR 100ML

Valor energético/calorias	3389 K.J./ 824Kcal
Proteínas	0g
Carboidratos	0g
Açúcares	0g

Gorduras Totais	92g
Gorduras Saturadas	14g
Gorduras Trans	0g
Gorduras Monossaturadas	69g
Gorduras Poli-insaturadas	9g
Fibra Alimentar	0g
Sal	0g

Fonte: Tabela adaptada de informações nutricionais do Azeite de oliva Venta del Baron

Durante as 15 semanas de experimentos, os animais eram pesados uma vez por semana, a fim de acompanhar o ganho de peso de cada animal e cada grupo.

Ao final das 15 semanas de intervenções os ratos foram eutanasiados. No dia anterior a eutanásia, foi retirada a alimentação e água dos animais, a fim de ficarem em jejum de 12 horas para as posteriores análises bioquímicas. Para a eutanásia, todos os animais foram primeiramente sedados com 0,8mL de hidrato de cloral a 15% através de injeção intra-abdominal foram decapitados, seguido as recomendações de Leary e colaboradores (2020) para essa técnica. Em seguida à decapitação foi coletada sangue em tubos (0,5mL) de fluoreto e gel separador de coágulos para as dosagens bioquímicas e após houve a remoção do tecido adiposo e fígado e posterior extração de RNA.

5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E PERFIL LIPÍDICO

As amostras de tecido adiposo e fígado foram submetidas a extração de RNA com kit PureLink™ RNA Mini- Invitrogen™ (Thermo Fischer Scientific™) após a morte dos ratos. Em seguida foram quantificadas (NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers – Thermo Fischer Scientific™), tratadas com DNase, e foi obtido o DNA complementar (cDNA) de todas as amostras a partir do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) de acordo com as especificações do fabricante. Os níveis de expressão dos genes *APOE*, *LIPC* e *APOB* serão obtidos por RT-PCR usando SYBR Green Real-time PCR Master Mixes (Thermo Fischer Scientific™) e pares de primers específicos.

O perfil lipídico (triacilglicerol – TG e colesterol total - CT) e glicemia foram mensurados com kits de diagnóstico comerciais adquiridos com LabTest Diagnóstica, utilizando os métodos colorimétricos-enzimáticos de acordo com as especificações do fabricante. Para a versão final da dissertação os dados de LDL-C (*Low density*

lipoprotein - cholestrol) e HDL-C (*High density lipoprotein - cholesterol*) serão incluídos. Na tabela 4 estão listadas as quantidades de amostras obtidas para cada variável analisada.

Tabela 4: Número amostral obtido para cada variável analisada

VARIÁVEL		N - APOB Fígado	N - APOB tec. Adi.	N - APOE Fígado	N - APOE tec. Adi.	N - LIPC Fígado	N - LIPC tec. Adi.	N - GRUPO	N TOTAL		
WESTERN	peso final	13	13	14	14	14	5	14	56		
	delta peso	13	13	14	14	14	5				
	WESTERN + SUPLEMENTO	consumo médio	13	13	14	14	14			5	
	glicose	12	12	13	13	13	5				
	triglicerídeos	11	11	12	12	12	3				
	colesterol	11	11	12	12	12	3				
	peso final	12	11	14	13	13	9			14	
	delta peso	12	11	14	13	13	9				
	WESTERN CONTROLE	consumo médio	12	11	14	13	13				9
	glicose	12	11	14	13	13	9				
	triglicerídeos	12	11	14	13	13	9				
	colesterol	12	11	14	13	13	9				
	peso final	13	14	14	14	14	8				14
	delta peso	13	14	14	14	14	8				
EASTERN + SUPLEMENTO	consumo médio	13	14	14	14	14	8				
glicose	13	14	14	14	14	8					
triglicerídeos	13	14	14	14	14	8					
colesterol	13	14	14	14	14	8					
EASTERN	peso final	13	13	13	14	13	8	14			
	delta peso	13	13	13	14	13	8				
	EASTERN CONTROLE	consumo médio	13	13	13	14	13		8		
	glicose	13	13	13	14	13	8				
	triglicerídeos	13	13	13	14	13	8				
	colesterol	13	13	13	14	13	8				

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados quantitativos (expressão gênica e os níveis dos parâmetros que compõem o perfil lipídico e glicemia) foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk. As médias de expressão gênica, consumo médio, delta peso (peso final – peso inicial), peso final e das variáveis bioquímicas foram comparadas par a par por

meio de testes paramétricos (Teste t) ou não paramétricos (Mann-Whitney) entre os grupos experimentais e o grupo controle.

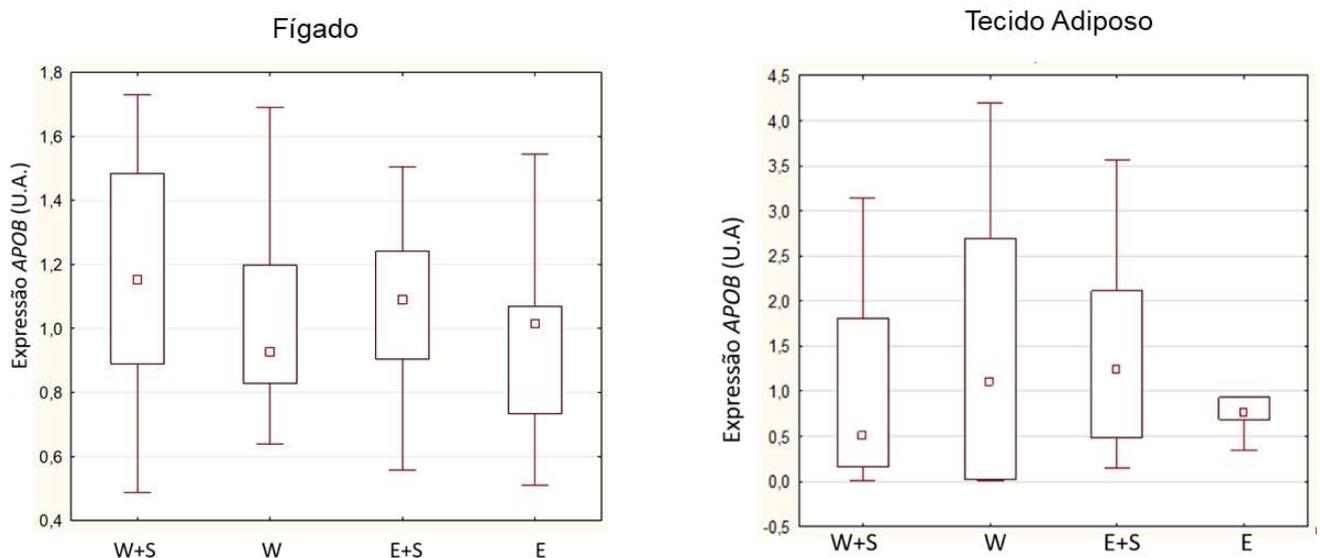
Análises de correlação de Spearman entre os níveis de expressão gênica e as demais variáveis foram realizadas, assim como análises de regressão múltipla, tendo os níveis de expressão gênica como variáveis dependentes, sendo os genes estudados as variáveis dependes. O nível de significância estatística adotado nas análises foi de 5%.

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISES DO EFEITO DO CONSUMO DE AZEITE DE OLIVA SOBRE A EXPRESSÃO DOS GENES *APOB*, *APOE* E *LIPC* FRENTE AS DIETAS WESTERN E EASTERN

As médias de expressão dos genes *APOB*, *APOE* e *LIPC* obtidas do tecido de fígado e adiposo dos animais foram comparadas entre os ratos que receberam dieta Western suplementada com azeite de oliva e seu respectivo controle, apenas dieta Western, bem como entre os ratos que receberam dieta Eastern suplementada com azeite de oliva e os ratos que receberam apenas a dieta Eastern. Apenas a média de expressão gênica de *LIPC* se mostrou diferente nessas comparações, e apenas no grupo Eastern, sendo que os animais suplementados apresentaram em média níveis de expressão mais elevados em comparação aos animais não suplementados, tanto no tecido hepático ($p=0,001$), quanto no tecido adiposo ($p=0,010$) (Figuras 4, 5 e 6). As expressões basais de *LIPC*, *APOB* e *APOE* para *Mus musculus* são respectivamente 144 FPKM (*Fragments per kilo base per million mapped reads*), 1755 FPKM e 10084 FPKM para tecido hepático, segundo dados do MIT. Não encontramos dados de expressão para o tecido adiposo dos genes *LIPC* e *APOB*, apenas *APOE*, apresentando 1880 FPKM (*Tissues - Tissue expression - 2021*).

FIGURA 4: EXPRESSÃO DO GENE *APOB* NOS TECIDOS DE FÍGADO E ADIPOSEO DE ANIMAIS SUBMETIDOS AS DIETAS WESTERN COM SUPLEMENTO, WESTERN CONTROLE, EASTERN COM SUPLEMENTO E EASTERN CONTROLE

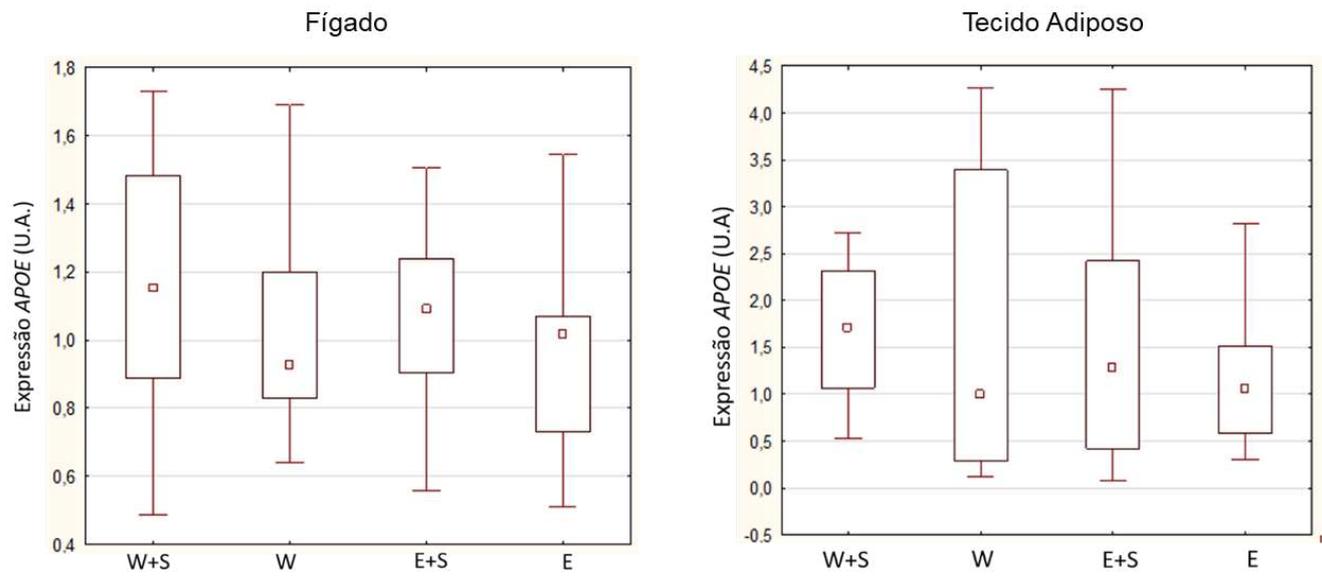


Fonte: O autor (2021).

Legenda: W+S: dieta Western mais suplemento de azeite de oliva extravirgem; W: dieta Western controle; E+S: dieta Eastern mais suplemento de azeite de oliva extravirgem; E: dieta Eastern controle; U.A: unidades arbitrárias.

Nota: As médias obtidas em W+S e em W foram semelhantes, assim como as obtidas em E+S e em E ($p>0,05$).

FIGURA 5: EXPRESSÃO DO GENE *APOE* NOS TECIDOS DE FÍGADO E ADIPOSEO DE ANIMAIS SUBMETIDOS AS DIETAS WESTERN COM SUPLEMENTO, WESTERN CONTROLE, EASTERN COM SUPLEMENTO E EASTERN CONTROLE

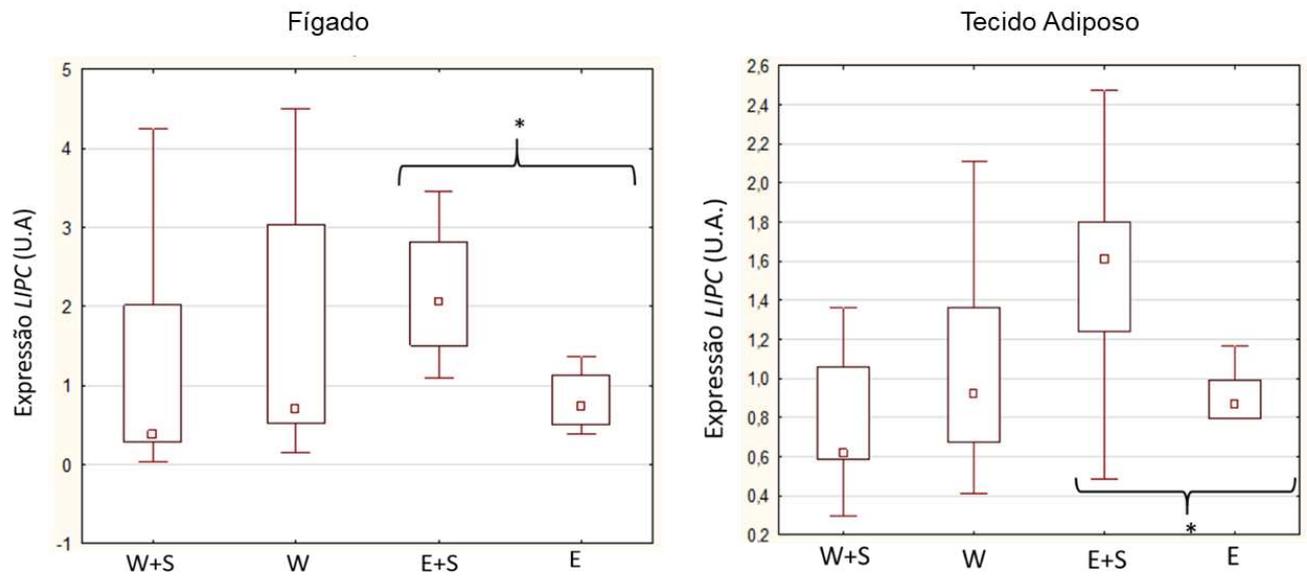


Fonte: O autor (2021).

Legenda: W+S: dieta Western mais suplemento de azeite de oliva extravirgem; W: dieta Western controle; E+S: dieta Eastern mais suplemento de azeite de oliva extravirgem; E: dieta Eastern controle; U.A: unidades arbitrárias.

Nota: As médias obtidas em W+S e em W foram semelhantes, assim como as obtidas em E+S e E ($p>0,05$).

FIGURA 6: EXPRESSÃO DO GENE *LIPC* NOS TECIDOS DE FÍGADO E ADIPOSEO DE ANIMAIS SUBMETIDOS AS DIETAS WESTERN COM SUPLEMENTO, WESTERN CONTROLE, EASTERN COM SUPLEMENTO E EASTERN CONTROLE



Fonte: O autor (2021).

Legenda: W+S: dieta Western mais suplemento de azeite de oliva extravirgem; W: dieta Western controle; E+S: dieta Eastern mais suplemento de azeite de oliva extravirgem; E: dieta Eastern controle; U.A: unidades arbitrárias.

Nota: * Média obtida em E+S foi maior que a média obtida no grupo E no tecido de fígado ($p=0,001$) e adiposo ($p=0,010$).

Modelos de regressão múltipla foram analisados a fim de se encontrar, dentre as variáveis analisadas, aquelas que poderiam estar causando variação nos níveis de expressão dos genes investigados em cada um dos tecidos, nos grupos Western (incluindo os animais suplementados e não suplementados) (Tabela 5), e no grupo Eastern (incluindo os animais suplementados e não suplementados) (Tabela 6).

TABELA 5: MODELOS DE ANÁLISES DE REGRESSÃO MÚLTIPLA NO GRUPO DE ANIMAIS SUBMETIDOS A DIETA WESTERN

Variável Dependente	Variáveis Independentes	$\beta \pm DP$	p
Níveis expressão <i>APOB</i> no fígado	Grupo experimental	-0,093±0,539	0,865
	Delta peso	-0,151±0,262	0,571
	Consumo médio	0,269±0,506	0,603
	Glicose	0,273±0,330	0,421
	Triglicerídeos	-0,449±0,318	0,179
	Colesterol	-0,079±0,300	0,0799
Níveis expressão <i>APOB</i> no tecido adiposo	Grupo experimental	0,221±0,435	0,620
	Delta peso	0,495±0,267	0,087
	Consumo médio	-0,029±0,466	0,951
	Glicose	-0,147±0,258	0,578
	Triglicerídeos	-0,036±0,270	0,893

	Colesterol	-0,342±0,270	0,227
Níveis expressão <i>APOE</i> no fígado	Grupo experimental	0,149±0,419	0,726
	Delta peso	0,040±0,224	0,857
	Consumo médio	-0,539±0,420	0,217
	Glicose	0,387±0,235	0,119
	Triglicerídeos	0,056±0,251	0,825
	Colesterol	0,049±0,244	0,843
Níveis expressão <i>APOE</i> no tecido adiposo	Grupo experimental	0,212±0,366	0,569
	Delta peso	-0,205±0,192	0,300
	Consumo médio	-0,238±0,373	0,532
	Glicose	-0,669±0,201	0,004
	Triglicerídeos	0,133±0,219	0,552
	Colesterol	-0,203±0,201	0,327
Níveis expressão <i>LIPC</i> no fígado	Grupo experimental	0,622±0,468	0,202
	Delta peso	0,277±0,247	0,279
	Consumo médio	-0,404±0,463	0,395
	Glicose	0,224±0,270	0,419
	Triglicerídeos	-0,161±0,291	0,587
	Colesterol	-0,451±0,270	0,114
Níveis expressão <i>LIPC</i> no tecido adiposo	Grupo experimental	-0,334±0,702	0,658
	Delta peso	-0,461±0,557	0,454
	Consumo médio	0,163±0,634	0,809
	Glicose	-0,059±0,530	0,916
	Triglicerídeos	0,253±0,509	0,644
	Colesterol	0,132±0,680	0,855

Fonte: O autor (2021).

Nota: Grupo experimental refere-se ao grupo Western suplementado com azeite de oliva (W+S) ou grupo Western controle (W).

No tecido adiposo dos animais do grupo Western, independentemente de receber ou não a suplementação com azeite de oliva, e independentemente do ganho de peso, consumo médio, níveis de triglicerídeos e colesterol, os níveis de glicose influenciaram os níveis de expressão do gene *APOE* ($p=0,004$) (Tabela 5).

TABELA 6: MODELOS DE ANÁLISES DE REGRESSÃO MÚLTIPLA NO GRUPO DE ANIMAIS SUBMETIDOS A DIETA EASTERN

Variável Dependente	Variáveis Independentes	$\beta \pm DP$	p
Níveis expressão <i>APOB</i> no fígado	Grupo experimental	0,142±0,238	0,557
	Delta peso	0,092±0,182	0,617
	Consumo médio	0,452±0,232	0,066
	Glicose	0,212±0,204	0,310
	Triglicerídeos	-0,294±0,197	0,152
	Colesterol	-0,401±0,193	0,051
Níveis expressão <i>APOB</i> no tecido adiposo	Grupo experimental	-0,102±0,318	0,751
	Delta peso	-0,123±0,217	0,576

	Consumo médio	-0,126±0,287	0,663
	Glicose	-0,177±0,245	0,476
	Triglicerídeos	0,253±0,251	0,0,324
	Colesterol	0,347±0,232	0,150
	Grupo experimental	-0,429±0,289	0,152
	Delta peso	0,015±0,202	0,940
Níveis expressão <i>APOE</i> no fígado	Consumo médio	0,111±0,269	0,683
	Glicose	-0,088±0,227	0,700
	Triglicerídeos	0,381±0,232	0,116
	Colesterol	0,426±0,216	0,062
	Grupo experimental	0,060±0,277	0,830
	Delta peso	-0,347±0,205	0,105
Níveis expressão <i>APOE</i> no tecido adiposo	Consumo médio	-0,256±0,258	0,330
	Glicose	-0,036±0,229	0,876
	Triglicerídeos	-0,121±0,232	0,606
	Colesterol	-0,183±0,217	0,410
	Grupo experimental	-0,830±0,236	0,002
	Delta peso	0,272±0,165	0,114
Níveis expressão <i>LIPC</i> no fígado	Consumo médio	0,184±0,219	0,411
	Glicose	-0,184±0,186	0,333
	Triglicerídeos	0,114±0,189	0,552
	Colesterol	0,027±0,177	0,880
	Grupo experimental	-0,661±0,274	0,039
	Delta peso	-0,269±0,242	0,294
Níveis expressão <i>LIPC</i> no tecido adiposo	Consumo médio	-0,232±0,318	0,482
	Glicose	0,216±0,320	0,515
	Triglicerídeos	0,346±0,331	0,323
	Colesterol	-0,053±0,269	0,848

Fonte: O autor (2021).

Nota: Grupo experimental refere-se ao grupo Eastern suplementado com azeite de oliva (E+S) ou grupo Eastern controle (E).

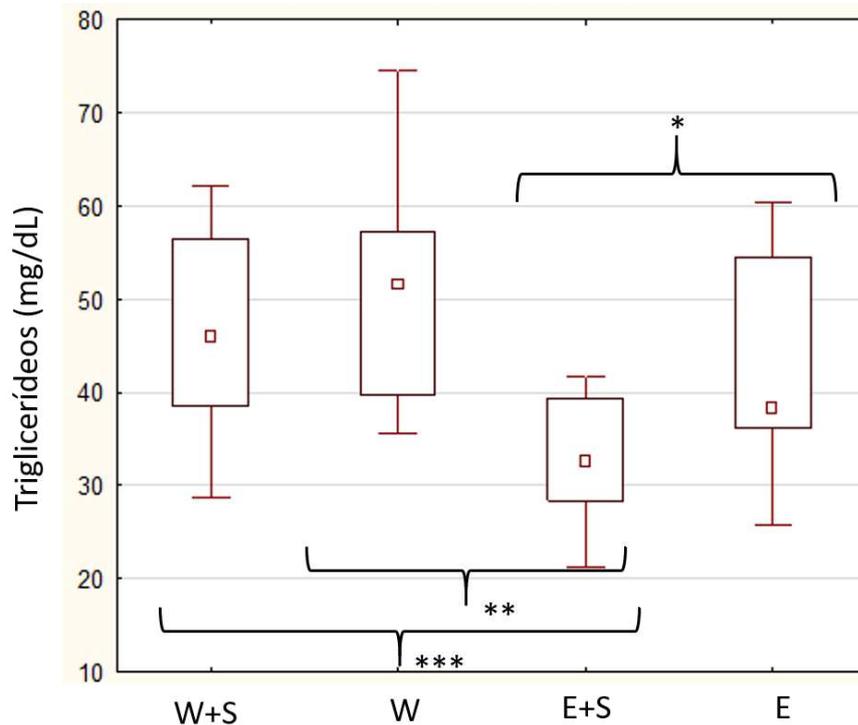
As análises de regressão no grupo Eastern confirmaram os resultados obtidos nos testes de comparação de médias, uma vez que a variável grupo experimental, compreendida como consumir ou não azeite de oliva mais a dieta Eastern, causou variação nos níveis de expressão de *LIPC* nos tecidos de fígado ($p=0,002$) e adiposo ($p=0,039$), mesmo corrigindo a análise para ganho de peso, consumo médio e variáveis bioquímicas (Tabela 6).

6.2 COMPARAÇÕES DAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS ENTRE OS GRUPOS

As médias dos níveis de triglicerídeos, colesterol e glicose (figuras 7, 8 e 9) foram comparadas entre os grupos. Apenas os níveis médios de triglicerídeos se

mostraram diferentes, sendo que os ratos submetidos a dieta Eastern suplementados com azeite de oliva apresentaram níveis mais baixos de triglicerídeos comparados aos animais do grupo Eastern não suplementados ($p=0,022$), e comparados aos animais que receberam a dieta Western suplementada com azeite de oliva ($p=0,003$) e não suplementada ($p=3,7 \times 10^{-4}$).

FIGURA 7: NÍVEIS MÉDIOS DE TRIGLICERÍDEOS (mg/dL) NOS ANIMAIS SUBMETIDOS AS DIETAS WESTERN COM SUPLEMENTO DE AZEITE DE OLIVA, WESTERN CONTROLE, EASTERN COM SUPLEMENTO DE AZEITE DE OLIVA E EASTERN CONTROLE

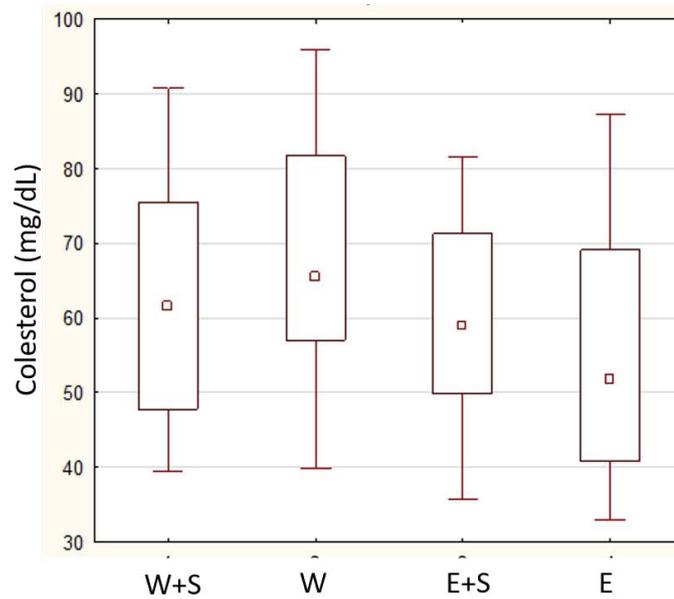


Fonte: O autor (2021).

Legenda: W+S: dieta Western mais suplemento de azeite de oliva extravirgem; W: dieta Western controle; E+S: dieta Eastern mais suplemento de azeite de oliva extravirgem; E: dieta Eastern controle.

Nota: * $p = 0,02$; ** $p = 3,70 \times 10^{-4}$; *** $p = 0,003$.

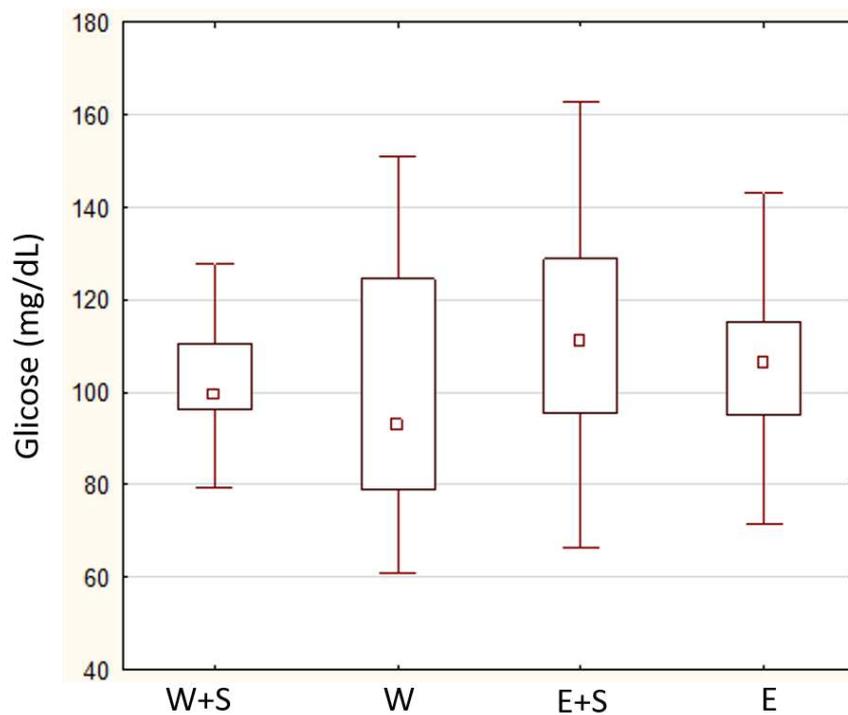
FIGURA 8: NÍVEIS MÉDIOS DE COLESTEROL TOTAL (mg/dL) NOS ANIMAIS SUBMETIDOS AS DIETAS WESTERN COM SUPLEMENTO DE AZEITE DE OLIVA, WESTERN CONTROLE, EASTERN COM SUPLEMENTO DE AZEITE DE OLIVA E EASTERN CONTROLE



Fonte: O autor (2021).

Legenda: W+S: dieta Western mais suplemento de azeite de oliva extravirgem; W: dieta Western controle; E+S: dieta Eastern mais suplemento de azeite de oliva extravirgem.

FIGURA 9: NÍVEIS MÉDIOS DE GLICOSE (mg/dL) NOS ANIMAIS SUBMETIDOS AS DIETAS WESTERN COM SUPLEMENTO DE AZEITE DE OLIVA, WESTERN CONTROLE, EASTERN COM SUPLEMENTO DE AZEITE DE OLIVA E EASTERN CONTROLE



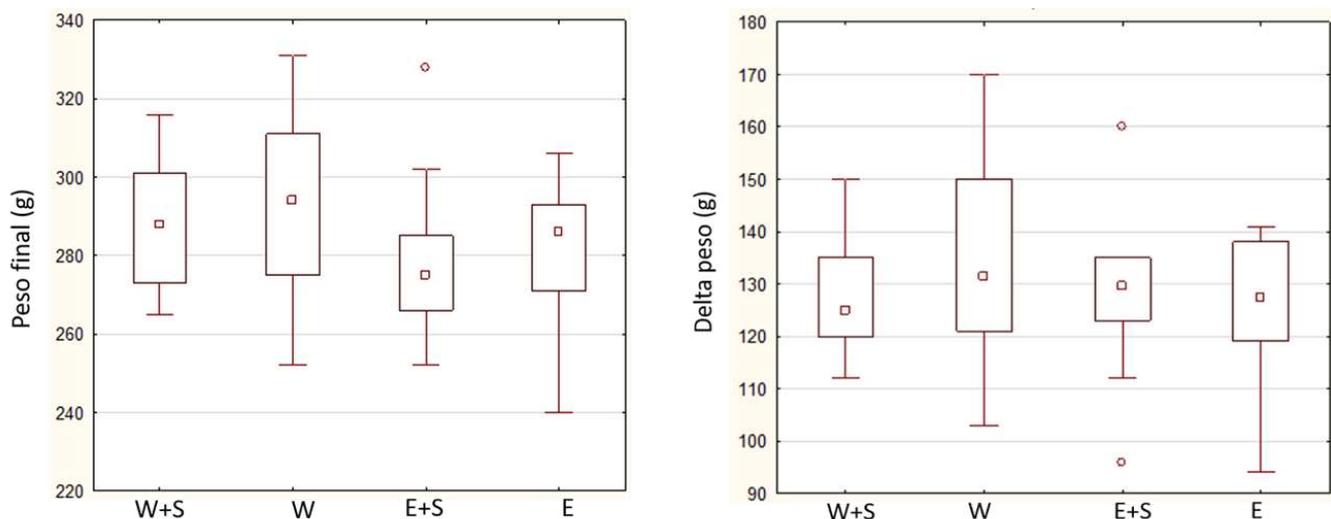
Fonte: O autor (2021).

Legenda: W+S: dieta Western mais suplemento de azeite de oliva extravirgem; W: dieta Western controle; E+S: dieta Eastern mais suplemento de azeite de oliva extravirgem.

6.3 COMPARAÇÕES DO PESO FINAL, GANHO DE PESO E INGESTÃO ALIMENTAR ENTRE OS GRUPOS

As médias de peso final (gramas), delta peso (peso final – peso inicial) e ingestão alimentar (gramas) também foram comparadas entre os grupos. O peso no final do experimento e o ganho de peso (delta peso) foi semelhante entre os animais, tanto entre W+S *versus* W e E+S *versus* E; quanto entre as dietas (W+S x E+S; W+S x E; W x E+S; W x E) (Figura 10).

FIGURA 10: MÉDIA DO PESO FINAL DOS ANIMAIS (g) E DELTA PESO (g) NOS ANIMAIS SUBMETIDOS AS DIETAS WESTERN COM SUPLEMENTO DE AZEITE DE OLIVA, WESTERN CONTROLE, EASTERN COM SUPLEMENTO DE AZEITE DE OLIVA E EASTERN CONTROLE



Fonte: O autor (2021).

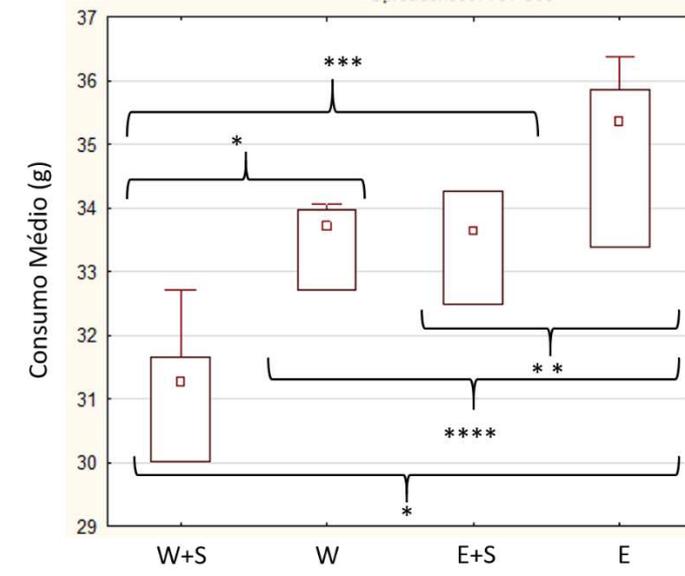
Legenda: W+S: dieta Western mais suplemento de azeite de oliva extravirgem; W: dieta Western controle; E+S: dieta Eastern mais suplemento de azeite de oliva extravirgem.

Nota: o delta peso foi calculado pela subtração do peso inicial do animal de seu peso ao final do experimento. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Já o consumo durante o período de intervenção nutricional (aplicação das dietas Western e Eastern), se mostrou diferente entre os grupos (Figura 11). Considerando separadamente cada dieta, os animais suplementados com azeite de oliva consumiram menos ração comparados aos seus respectivos controles (W+S *versus* W $p=0$; E+S *versus* E $p=4,21 \times 10^{-4}$). Além disso, a comparação entre as dietas

revelou que os animais submetidos a dieta Western suplementados apresentaram menor consumo alimentar comparados aos animais submetidos a dieta Eastern suplementados ($p=1,0 \times 10^{-6}$) e não suplementados ($p=0$). É possível visualizar todos esses dados na tabela 7.

FIGURA 11: CONSUMO MÉDIO DOS ANIMAIS (g) SUBMETIDOS AS DIETAS WESTERN COM SUPLEMENTO DE AZEITE DE OLIVA, WESTERN CONTROLE, EASTER COM SUPLEMENTO DE AZEITE DE OLIVA E EASTER CONTROLE



Fonte: O autor (2021).

Legenda: W+S: dieta Western mais suplemento de azeite de oliva extravirgem; W: dieta Western controle; E+S: dieta Eastern mais suplemento de azeite de oliva extravirgem; *: consumo com diferenças significativas entre as dietas W+S versus W, e W+S versus E, $p = 1,1 \times 10^{-5}$; **: consumo com diferenças significativas entre as dietas E+S versus E, $p = 4,21 \times 10^{-4}$; *** consumo com diferenças significativas entre as dietas W+S versus E+S, $p = 1,00 \times 10^{-6}$; ****: consumo com diferenças significativas entre as dietas W versus E, $p = 2,32 \times 10^{-2}$.

TABELA 7 : INFORMAÇÕES SOBRE MÉDIA E VALOR DE O PARA GANHO DE PESO, PESO FINAL E INGESTÃO ALIMENTAR DOS ANIMAIS

	W+S versus E+S		W+S versus E		Wx E versus S		W versus E	
	média	p value	média	p value	média	p value	média	p value
Ganho de peso	129,350	0,716	129,350	0,581	136	0,221	136	0,165
Peso Final	288	0,165	288	0,336	294,280	0,057	294,28	0,118
Ingestão (consumo)	31,240	0,000	31,24	0,000	33,510	0,887	33,510	0,000

Fonte: O autor (2021).

Nota: valores em negrito representam coeficientes de correlação de Spearman com $p < 0,05$.

6.4 ANÁLISES DA RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES *APOB*, *APOE* E *LIPC* E AS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS, PESO FINAL E DELTA PESO, E CONSUMO ALIMENTAR

Testes de correlação foram aplicados para investigar a relação entre os níveis de expressão dos genes *APOB*, *APOE* e *LIPC* e as demais variáveis nos grupos experimentais separadamente. A interpretação dos valores de correlação obedeceu a classificação de Dancey e Reidy: $r = 0,10$ até $0,30$ como fraco; $r = 0,40$ até $0,6$ como moderado e $r = 0,70$ até 1 como forte (FILHO D. B. F & JUNIOR J. A. da S; 2009). Nos animais submetidos a dieta Western mais suplementação, foi possível observar que níveis mais elevados de expressão de *APOE* no fígado foram correlacionados de forma moderada a níveis mais elevados de glicose ($R=0,626$, $p=0,021$). Já no tecido adiposo dos animais do grupo Western controle, foi observada uma correlação negativa forte entre a expressão de *APOE* e níveis de glicose ($p=5,54 \times 10^{-3}$), observada também na análise de regressão mesmo após correção para delta peso, consumo médio, níveis de triglicerídeos e colesterol total; e negativa moderada entre a expressão de *APOE* e consumo médio ($p=0,023$) e peso final ($p=0,032$). Além disso, os animais Western controle com níveis mais elevados de expressão de *LIPC* no tecido adiposo apresentaram também maiores níveis de triglicerídeos ($p=0,009$) (Tabela 8). A única correlação reproduzida no grupo Western independentemente da suplementação foi entre a expressão do gene *APOE* em tecido adiposo e níveis de glicose ($p=1,43 \times 10^{-3}$).

TABELA 8: ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES *APOB*, *APOE* E *LIPC* NO FÍGADO E TECIDO ADIPOSEO E VARIÁVEIS COLETADAS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS WESTERN SUPLEMENTADO E WESTERN CONTROLE

Grupo Western suplementado						
	Peso final	Delta peso	Consumo médio	Glicemia	Triglicerídeos	Colesterol
<i>APOB</i> fígado	-0,087	-0,085	0,128	0,041	-0,172	-0,309
<i>APOE</i> fígado	-0,301	-0,291	-0,222	0,626	0,545	-0,034
<i>LIPC</i> fígado	-0,028	0,112	-0,047	0,093	0,090	-0,279
<i>APOB</i> tec. adiposo	0,175	0,176	0,487	0,000	-0,345	-0,536
<i>APOE</i> tec. adiposo	0,305	0,313	0,365	-0,428	-0,335	-0,251
<i>LIPC</i> tec. adiposo	0,200	0,300	0,263	0,800	-1,000	-0,500
Western controle						
	Peso final	Delta peso	Consumo médio	Glicemia	Triglicerídeos	Colesterol
<i>APOB</i> fígado	-0,132	-0,339	0,263	0,097	-0,454	-0,139

APOE fígado	0,485	0,264	-0,158	0,239	-0,019	0,107
LIPC fígado	0,000	0,076	0,196	0,142	-0,258	-0,197
APOB tec. adiposo	0,309	0,381	-0,107	-0,381	0,036	-0,227
APOE tec. adiposo	-0,593	-0,462	-0,620	-0,719	-0,450	-0,153
LIPC tec. adiposo	-0,266	-0,300	-0,212	0,116	0,800	0,133

Fonte: O autor (2021).

Nota: valores em negrito representam coeficientes de correlação de Spearman com $p < 0,05$.

Em relação ao grupo Eastern outras correlações foram encontradas (tabela 9). No grupo suplementado foi identificada correlação positiva e moderada entre a expressão do gene *APOB* no fígado e o consumo médio dos animais ($p=0,019$). A expressão de *LIPC* no fígado também foi correlacionada positivamente de forma moderada com o consumo médio dos animais ($p=0,048$), e negativamente de forma moderada com os níveis de glicose ($p=0,049$). No grupo Eastern sem suplementação, houve correlação positiva e moderada entre a expressão do gene *APOE* no fígado com os níveis de colesterol ($p=4,37 \times 10^{-2}$); correlação forte e positiva entre a expressão de *LIPC* no fígado e o peso final dos animais ($p=0,005$) e correlação positiva e moderada com os níveis de glicose ($p=0,026$). Há, ainda neste grupo, a correlação negativa e moderada da expressão do gene *APOB* no tecido adiposo com delta peso dos animais ($p=0,044$) e a correlação negativa e moderada da expressão do gene *APOE* no tecido adiposo e os níveis de triglicerídeos ($p=0,018$) (Tabela 8). As únicas correlações reproduzidas no grupo Eastern independentemente da suplementação foram entre os níveis de expressão do gene *APOB* no fígado e o peso final dos animais ($p=0,029$) e o consumo médio ($p=0,008$); assim como a correlação positiva e moderada da expressão do gene *APOE* no fígado e os níveis de colesterol ($p=0,034$). Para o tecido adiposo, foi reproduzida a correlação negativa e moderada da expressão de *APOB* e o peso final ($p=0,032$) e a correlação, também negativa e moderada, da expressão de *LIPC* e o consumo médio ($p=0,022$).

TABELA 9: ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES APOB, APOE E LIPC NO FÍGADO E TECIDO ADIPOSEO E VARIÁVEIS COLETADAS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS EASTERN SUPLEMENTADO E EASTERN CONTROLE

	Grupo Eastern suplementado					
	Peso final	Delta peso	Consumo médio	Glicemia	Triglicerídeos	Colesterol
APOB fígado	0,167	0,071	0,637	-0,247	-0,269	-0,197
APOE fígado	-0,154	-0,108	0,280	-0,125	-0,112	0,208
LIPC fígado	0,222	0,358	0,535	-0,534	-0,107	-0,142
APOB tec. adiposo	-0,385	0,024	-0,241	-0,090	0,459	0,243
APOE tec. adiposo	-0,138	-0,373	0,214	-0,006	0,296	0,050

LIPC tec. adiposo	-0,479	-0,390	-0,260	0,309	0,142	0,190
Eastern controle						
	Peso final	Delta peso	Consumo médio	Glicemia	Triglicerídeos	Colesterol
APOB fígado	0,547	0,431	0,418	0,098	-0,065	-0,445
APOE fígado	0,269	-0,082	-0,300	0,532	0,489	0,565
LIPC fígado	0,715	0,038	-0,059	0,609	0,318	0,247
APOB tec. adiposo	-0,253	-0,563	0,000	0,219	-0,027	0,153
APOE tec. adiposo	-0,404	-0,011	-0,460	-0,68	-0,617	0,239
LIPC tec. adiposo	-0,214	-0,562	-0,692	0,428	0,071	0,428

Fonte: O autor (2021).

Nota: valores em negrito representam coeficientes de correlação de Spearman com $p < 0,05$.

7 DISCUSSÃO

Este estudo tem por objetivo de investigar se o consumo de azeite de oliva extravirgem possui efeito modulador sobre a expressão de genes relacionados ao perfil lipídico quando em combinação com dois padrões de alimentação. Nesse contexto, dentre os genes investigados, apenas o gene *LIPC* pareceu ser sensível aos efeitos nutrigenômicos já descritos do azeite de oliva, e ainda, tal efeito foi restrito a dieta Eastern, o que permite hipotetizar que, pelo menos no que diz respeito às vias metabólicas que envolvem o produto gênico de *LIPC*, os efeitos benéficos do consumo de azeite de oliva só se apresentam quando em conjunto com uma dieta equilibrada.

O azeite de oliva extravirgem é rico em ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs - do inglês *Monounsaturated Fatty Acids*), principalmente ácido oleico 55-83% (chamado também de ômega 9), cerca de 4-20% de PUFA's (do inglês *Polyunsaturated Fatty Acids*) - ácidos linoleico e alfa-linoleico, ácidos graxos saturados, 8 -14%, como palmíticos e esteárico, além compostos bioativos como polifenóis, tocoferóis, vitaminas e outros. É atribuído principalmente aos ácidos graxos monoinsaturados os benefícios relacionados a prevenção de doenças cardiovasculares, melhora do perfil lipídico, aumento da estabilidade oxidativa e melhora de marcadores inflamatórios. Dentre a classe de compostos bioativos do tipo polifenóis presentes no azeite, o hidroxitiroso (HT) é reconhecido como um dos principais, possuindo atividade anti-inflamatória e antiteratigênica, contribuindo também para o melhoramento do perfil lipídico, redução do estresse oxidativo e atua na expressão de receptores PPAR γ e α (MARCELINO et. al., 2019). Em nosso estudo, as dietas formuladas com padrões nutricionais Western e Eastern não

continham quantidades significativas de ácidos graxos monoinsaturados, dessa forma podemos afirmar que a suplementação com o azeite de oliva foi aplicada de forma equivalente para os dois grupos de animais.

Em uma metanálise, Schwingshackl e Hoffmann relataram que uma dieta tipicamente ocidental contempla o consumo de ácidos graxos monoinsaturados, no entanto, de origem predominantemente animal, rica em derivados de carnes, gorduras adicionais e produtos lácteos, diferentemente de países com alimentação mais equilibrada, que têm sua fonte de MUFAS predominantemente oriundas do azeite de oliva extravirgem. Além disto, identificaram que somente os ácidos graxos oriundos do azeite de oliva extravirgem apresentavam associação com o risco reduzido de eventos cardiovasculares, ao oposto do observado para a mesma análise considerando as MUFAS de origem animal e vegetal (SCHWINGSHACKL; HOFFMANN, 2014). No contexto nutrigenômico, estudos prévios relatam efeitos modulatórios do azeite em vários genes relacionados ao metabolismo energético, o que possivelmente estaria subjacente aos efeitos fisiológicos positivos relatados anteriormente. Um exemplo é o estudo *in vivo* de Konstanidou e colaboradores (2010), onde foi observado que a administração de azeite de oliva extravirgem, com ou sem os bioativos polifenóis, frente a uma dieta saudável (dieta padrão mediterrânea) reduziu a expressão de genes relacionados a inflamação (*IFN γ* e *IL-7R*), metabolismo lipídico (*ARHGAP15*), estresse oxidativo (*ADRB2*) e reparo de DNA (*POLK*) em comparação com a dieta habitual dos participantes (KONSTANIDOU et. al., 2010).

Até o presente momento não foram encontrados outros estudos que verificaram o efeito nutrigenômico do azeite em combinação com dietas hipercalóricas, como a dieta padrão Western, utilizada no presente estudo. Nossos resultados indicam que o efeito benéfico do azeite de oliva pode ser dependente de outros fatores da dieta, o que significa que a administração e utilização de “alimentos saudáveis” de forma pontual e genérica pode não apresentar o efeito desejado. Nesse sentido, a partir de uma metanálise, De Santis e colaboradores (2019) afirmam que o estado de saúde do indivíduo que recebe a ingestão de azeite de oliva extravirgem é importante para que ocorra a modulação da transcrição dos genes alvos.

No que diz respeito a interação entre a expressão do gene *LIPC*, cujo produto gênico é a lipase hepática, e o consumo de azeite de oliva observada no presente estudo, o aumento da expressão de *LIPC* frente ao consumo de azeite de oliva pode,

em partes, ser explicado pela regulação positiva de USF1 (*Upstream Transcription Factor1*) da região proximal do gene *LIPC* (DEURSEN et. al., 2009).

A lipase hepática é uma enzima chave no metabolismo lipídico, realiza a hidrólise de lipídeos, lipoproteínas remanescentes de HDL e sua captação hepática (CEDÓ et. al., 2017). Seguindo sua secreção no fígado, a enzima é transportada para superfície endotelial onde catalisa a hidrólise de TG e fosfolipídios para a produção de remanescentes de quilomícrons, LDL e HDL. Em condições normais, a lipase hepática promove a captação de LDL e reverte o transporte de colesterol por meio do HDL, no entanto, em uma condição de hipertrigliceridemia a troca lipídica mediada por CETP (*cholesterol ester transfer protein*) também aumenta, assim os quilomícrons remanescentes e VLDL serão ricos em colesterol esterificado enquanto LDL e HDL se tornarão ricos em triglicerídeos e pobres em colesterol. Dessa forma, a lipólise dessas moléculas, pela lipase hepática, resultará na produção de LDL aterogênico e HDL pequeno e denso, que será rapidamente removido da circulação (NIMMO et. al. 1997).

Nesse contexto, Deursen e colaboradores investigaram o efeito do oleato de ácido graxo (MUFA) sobre a expressão do gene da lipase hepática (*LIPC*). Para isso, foram utilizadas células do fígado humano (HepG2) *in vitro* suplementadas com oleato e incubadas por 48h, após esse período eles verificaram o aumento do mRNA de lipase hepática ($p < 0,01$) (DEURSEN et. al., 2009). Apesar de não identificarem claramente esse mecanismo, relataram o aumento da expressão do gene *USF*, elevando a presença de fatores de transcrição USFs. USF1 e 2 são fatores de transcrição envolvidos na regulação de genes do perfil lipídico, incluindo enzimas responsivas à insulina e lipogênicas expressas no fígado. A ligação de USF1 ao seu local cognato na região promotora aumentou fortemente a transcrição da lipase hepática. (DEURSEN et. al., 2009).

Os níveis de expressão de *LIPC* mais elevados nos animais que consumiram a dieta Eastern suplementada com azeite de oliva possivelmente possui relação com os níveis de triglicerídeos mais baixos encontrados nesse grupo. De acordo com Andrés-Blasco e colaboradores (2015), a lipase hepática é a enzima chave no metabolismo lipídico, realizando a hidrólise dos triglicerídeos para facilitar sua depuração e metabolismo, sendo a falta ou diminuição dela agente causador de hipertrigliceridemia e lesões como o ateroma. Dessa forma, níveis mais elevados de expressão de *LIPC* podem estar associados a maior quantidade da enzima codificada por esse gene, dessa forma a hidrólise dos triglicerídeos pode ter sido favorecida no grupo Eastern

suplementado, resultando em níveis mais baixos de triglicerídeos, o que pode ser considerado um efeito cardioprotetor. A suplementação com azeite de oliva contribuiu para esse resultado, no entanto, a própria dieta influencia os níveis de lipídeos séricos. Sabe-se que a dieta com alto teor de gordura afeta negativamente a saúde metabólica. A composição dos alimentos e seu conteúdo calórico desempenham um papel fundamental nesse sentido (DEDUAL et. al., 2019). Uma dieta hipercalórica e a falta de exercícios físicos promove o acúmulo de gordura hepática e corporal (PARRY; HODSON 2017). No entanto, independentemente da suplementação com azeite de oliva, o consumo da dieta Western em comparação com o consumo da dieta Eastern não foi capaz de induzir a níveis mais elevados de triglicerídeos séricos, o que sugere que em nosso estudo o consumo do azeite de oliva foi determinante nesse sentido.

Em relação ao consumo alimentar e o ganho de peso dos animais, é comum que ratos alimentados com dietas hipercalóricas consumam menos alimento comparados aos animais alimentados com dietas controle, ou menos calóricas, resultado que foi observado em nosso estudo também. Bortolin e colaboradores (2018) observaram que ao final das 16 semanas de experimento, os ratos alimentados com dietas obesogênicas, dentre essas a dieta do tipo Western, consumiram menos ração (gramas por animal), comparados aos ratos que consumiram a dieta controle, porém os ratos alimentados com a dieta Western ganharam mais peso comparados ao controle (BORTOLIN et. al., 2018), o que não ocorreu em nosso estudo. Possivelmente o fato dos ratos alimentados com a dieta Eastern consumirem mais ração levou ao equilíbrio no ganho de peso entre os grupos.

Dentre as correlações observadas entre as variáveis investigadas, a mais significativa foi entre os níveis de expressão do gene *APOE* e os níveis de glicose. O gene *APOE* codifica a principal apoproteína do quilomícron, sendo essencial para o catabolismo normal da lipoproteína rica em TG (*APOE* apolipoprotein E [Homo sapiens (humano)] - Gene-NCBI, 2021)). Seu produto, a ApolipoproteínaE é importante para a remoção de remanescentes de quilomícrons e IDLs pelo fígado, ligando essas partículas ao receptor de LDL. Sabe-se que a apolipoproteínaE dos camundongos é cerca de 70% homóloga a proteína humana. Um estudo sobre a hiperlipoproteinemia disfuncional revelou polimorfismos no gene *APOE* que refletem em isoformas da ApoE humana (GETZ; REARDON, 2016). Assim, *APOE* existe em humanos como três isoformas principais E2, E3 e E4, sendo a última expressa em 20% da população

(WILLIAMS et. al., 2021), 75-85% para E3 e 4-13% para E2 na população (GETZ; REARDON, 2016).

No trabalho de Bagen e colaboradores (2016), é relatada uma correlação significativa entre o alelo E4 e a elevação dos níveis de glicose (GETZ; REARDON, 2016). Indivíduos portadores do alelo E4 codificam menos ApoE em comparação com portadores de outros alelos (ARENDRT et. al., 1997). Quando o alelo E4 se faz presente no indivíduo ele diminui a atividade da enzima degradadora de insulina (CLARO, A.P. dos S, 2016), isso faz com que os níveis de glicose circulante diminuam, pois, a sinalização da insulina persiste por mais tempo, induzindo a diminuição da glicose sérica por entrada dela nos tecidos. O inverso também verdadeiro, quando há elevada atividade da enzima que degrada insulina, aumentam os níveis de glicose circulantes. Esse mecanismo pode explicar indiretamente a relação observada em nosso estudo entre os níveis mais elevados de *APOE* e níveis mais baixos de glicose.

As limitações desse estudo incluíram a falta da análise da expressão do gene *LIPG*, devido a falhas técnicas envolvendo o primer do gene, bem como a falta das dosagens de HDL e LDL por falta de tempo hábil para padronização das técnicas.

Em linhas gerais é possível concluir que o efeito nutrigenômico do azeite de oliva depende da interação com uma dieta saudável, sendo que seus efeitos positivos impactam diretamente na melhora do risco para doenças cardiovasculares e o mecanismo subjacente a essa interação possivelmente envolve o gene *LIPC*.

8 CONCLUSÃO

- Podemos concluir que a expressão do gene *APOB* não sofreu modulação frente a ingestão de azeite de oliva extravirgem.
- Apesar da expressão do gene *APOE* não apresentar diferenças frente as dietas e suplementos, ele apresentou correlação positiva e moderada da média de expressão com os níveis de glicose nos animais no grupo Western que receberam suplemento, o que não ocorreu em seu grupo controle sem suplemento, corroborando a hipótese de que o suplemento tem ação modulatória nesse perfil. Já no grupo que recebeu a dieta Eastern sem suplemento, a expressão de *APOE* teve diferenças significativas quando correlacionadas com os níveis triglicéridos, neste caso, o efeito positivo da dieta saudável sobrepôs o efeito do suplemento. Para o gene *LIPC*, a correlação forte e positiva para os triglicéridos no tecido adiposo do grupo Western sem suplemento,

nos mostra que o efeito da dieta se sobrepõe ao efeito do suplemento. Enquanto para o grupo Eastern que recebeu suplemento houve correlação negativa e moderada para os níveis de glicose no fígado, enquanto, em seu grupo controle a correlação foi positiva, indicando que o suplemento pode estar influenciando nessas correlações.

- Observamos que existe correlação entre a glicemia e a expressão de genes tanto no tecido adiposo quanto no fígado, como a expressão dos genes *APOE* no fígado e tecido adiposo e *LIPC* apenas no fígado. E para a expressão de *LIPC* correlacionado apenas no tecido adiposo e com triglicerídeos.

- Com relação ao consumo médio e ganho de peso dos animais, podemos concluir que o gene *APOE* é expresso significativamente diferente no tecido adiposo na dieta Western e na dieta Eastern suplemento com diferença significativa para a expressão de *LIPC* no fígado. Nestes casos, o azeite de oliva extravirgem apresenta seu potencial bioativo apenas quando está em conjunto com uma alimentação saudável.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, Catarina B.; SPICKETT, Corinne M., Lipoproteins as targets and markers of lipoxidation, **Redox Biology**, 2019.
- ALETH, Dalpai; BARSCHAK, Gatto, **Bioquímica Médica para iniciantes**, 2018.
- ANDERSON, Cheryl A.M.; AL-ROUSAN, Tala; WRIGHT, C. Michael, Primary Prevention of Weight Gain Is Essential to Promote Cardiovascular Health, **Journal of the American Heart Association**, 2019.
- ANDRÉS-BLASCO, Irene *et al*, Hepatic lipase deficiency produces glucose intolerance, inflammation and hepatic steatosis, **Journal of Endocrinology**, 2015.
- Apolipoproteína B APOB [Homo sapiens (humano)] - Gene - NCBI**, disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/338>>, acesso em: 9 ago. 2020.
- APOE apolipoprotein E [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI**, disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/348>>, acesso em: 9 ago. 2020.
- ARENDT, Thomas *et al*, Plastic Neuronal Remodeling Is Impaired in Patients with Alzheimer's Disease Carrying Apolipoprotein 4 Allele, **The Journal of Neuroscienc**, 1997.
- BERNÁ, Genoveva *et al*, Nutrigenetics and nutrigenomics insights into diabetes etiopathogenesis, **Nutrients**, 2014.
- BORTOLIN R. C. *et. al.*, A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. **Journal of Obesity**, 2018.
- BRASIL, **Guia Alimentar para a População Brasileira Guia Alimentar para a População Brasileira**, 2014.
- BRASILEIRA, Sociedade, Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose, 2017.
- BURDGE, Graham C.; CALDER, Philip C., Introduction to fatty acids and lipids, World Review of Nutrition and Dietetics, 2015
- Carlos Roberto Antunes dos Santos, História da Alimentação**, disponível em: <<http://www.historiadaalimentacao.ufpr.br/artigos/artigo013.html>>, acesso em: 3 maio 2020.
- CEDÓ, Lúdia *et al*, Human hepatic lipase overexpression in mice induces hepatic steatosis and obesity through promoting hepatic lipogenesis and white adipose tissue lipolysis and fatty acid uptake, **PLoS ONE**, 2017.
- CLARO, Ana Paula dos Santos, Ação da insulina no desenvolvimento da doença de Alzheimer e perspectivas de tratamento, 2016.
- DE ANDRADE, Fabiana M; HUTZ, Mara H, O componente genético da determinação dos lipídeos séricos, **Ciência & Saúde Coletiva**, 2002.
- DE SANTIS, Stefania *et al*, Extra virgin olive oil: Lesson from nutrigenomics, **Nutrients**, 2019.
- DEDUAL, Mara A. *et al*, Intermittent fasting improves metabolic flexibility in short-term high-fat diet-fed mice, **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, 2019.
- DREWNOWSKI, Adam *et al*, The Nutrition Transition : New Trends in the Global Diet, n. February, 1997.

EL, Sedef N.; KARAKAYA, Sibel, Olive tree (*Olea europaea*) leaves: Potential beneficial effects on human health, **Nutrition Reviews**, 2009.

FARHUD, D; YEGANESH, ZARIF M, Nutrigenomics and Nutrigenetics, Iranian Journal of Public Health, 2010.

FARRÀS, Marta et al, Olive oil polyphenols enhance the expression of cholesterol efflux related genes in vivo in humans. A randomized controlled trial, **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2013.

FRANCISQUETI, Fabiane Valentini; NASCIMENTO, André Ferreira do; CORREA, Camila Renata, Obesidade, inflamação e complicações metabólicas, *Nutrire*, 2015.

FEDERAL, Universidade, HISTÓRIA E ALIMENTAÇÃO: O ADVENTO DO FAST FOOD EM CURITIBA Mitzy Tannia Reichembach Danski, v. 17, p. 19–29, 2008.

FENECH, Michael et al, Nutrigenetics and nutrigenomics: Viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice, **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, 2011.

FERGUSON, Lynnette R., Nutrigenomics Approaches to Functional Foods, **Journal of the American Dietetic Association**, 2009.

FIGUEIREDO, Helena Rodrigues; CARVALHO, Viviel Rodrigo J, ALIMENTOS FUNCIONAIS: Compostos bioativos e seus efeitos benéficos à saúde, 2015.

FISCHLER, Claude, Food, self and identity, **Social Science Information**, 1988.

FITÓ, Montserrat; KONSTANTINIDOU, Valentini, Nutritional genomics and the mediterranean Diet's effects on human cardiovascular health, **Nutrients**, 2016.

GADELHA, Carlos alberto de Almeida, **Bioquímica Estrutural**, Coordenação. João Pessoa - PB: Universidade Federal da Paraíba, 2011.

GAESSER, Glenn A, Perspective: Refined Grains and Health: Genuine Risk, or Guilt by Association?, **Advances in Nutrition**, 2019.

GeneCard- The Human Gene Database. Disponível em: < <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=APOB>, 2021.

GeneCard- The Human Gene Database. Disponível em: < <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LIPC>, 2021.

GETZ, Godfrey S.; REARDON, Catherine A., Thematic review series: Living history of lipids: ApoE knockout and knockin mice: The history of their contribution to the understanding of atherogenesis, **Journal of Lipid Research**, 2016.

HTUN, Nay Chi et al, Food intake patterns and cardiovascular risk factors in Japanese adults: Analyses from the 2012 National Health and nutrition survey, Japan, **Nutrition Journal**, 2017.

IMAMURA, Fumiaki *et al*, Generalizability of dietary patterns associated with incidence of type 2 diabetes mellitus, **American Journal of Clinical Nutrition**, 2009.

KIM, Sun Woong *et al*, PPAR γ regulates meibocyte differentiation and lipid synthesis of cultured human meibomian gland epithelial cells (hMGEC), **Ocular Surface**, 2018.

KONSTANTINIDOU, Valentini et al, In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial, **The FASEB Journal**, 2010.

LIMA, Emerson Silva; COUTO, Ricardo David, Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade, **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 2006.

LO MONACO, Grégory; BONETTO, Eric, Social representations and culture in food studies, **Food Research International**, 2019.

MACEDO, Alessandra, **Avaliação de parâmetros clínicos e nutricionais em pacientes com hipercolesterolemia familiar heterozigótica**, 2006.

MARANHÃO, Raul C, Metabolismo dos quilomícrons e risco de desenvolvimento de doença arterial coronária, **Atheros**, 2002.

MARCELINO, Gabriela et al, Effects of Olive Oil and Its Minor Components on Cardiovascular Diseases, Inflammation, and Gut Microbiota, **Nutrients**, 2019.

MEDEIROS, Giselle; PESSOA-PB, João, **SAÚDE : Tecnologia , Saúde e Meio Ambiente à Serviço da Vida SAÚDE : Tecnologia , Saúde e Meio Ambiente à Serviço da Vida**, 2012.

MORATOYA, Elsie Estela *et al*, Mudanças no padrão de consumo alimentar no Brasil, **Revista de Política Agrícola**, 2013.

MOZAFFARIAN, Dariush, Dietary and Policy Priorities for CVD, diabetes and obesity - a comprehensive RV, **Circulation**, 2016.

MÜLLER, Michael; KERSTEN, Sander, Nutrigenomics: Goals and strategies, **Nature Reviews Genetics**, 2003.

MURAKAMI, Kentaro; LIVINGSTONE, M. Barbara E.; SASAKI, Satoshi, Thirteen-year trends in dietary patterns among Japanese adults in the national health and nutrition survey 2003-2015: Continuous westernization of the Japanese diet, **Nutrients**, 2018.

NELSON, D. L., COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5ª. Ed. Artmed, Porto Alegre–RS, 2011. Pg. 529

NIMMO, Louise; MCCOOL, Avril, Regulation of hepatic lipase expression in HepC2 cells. Biochemical Society Transactions, 1997.

NOGUEIRA, CHRISTIANE MAPHEU, **Departamento De Química Programa De Pós-Graduação Em Ciências**, 2010.

OGCE, Filiz *et al*, Comparison of Mediterranean, Western and Japanese diets and some recommendations, **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 2008.

OJOPI, E P B; BERTONCINI, A B; NETO, E D, Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer Artigo Original, Revista de Psiquiatria Clínica, 2004.

POMIN, VH. E MOURÃO, PAdeS, Carboidratos de adoçantes a medicamentos, **Ciência Hoje**, 2006.

ORGÂNICA, Química; THOMSON, Editora, **Química orgânica**, SÃO PAULO, BRAZIL, 2005.

PARK, Sungha *et al*, RAGE and cardiovascular disease, **Frontiers in Bioscience**, 2011.

PARRY, Siôn A.; HODSON, Leanne, Influence of dietary macronutrients on liver fat accumulation and metabolism, **Journal of Investigative Medicine**, v. 65, n. 8, p. 1102–1115, 2017.

PEDRET, Anna *et al*, Cardiovascular Benefits of Phenol-Enriched Virgin Olive Oils: New Insights from the Virgin Olive Oil and HDL Functionality (VOHF) Study, **Molecular Nutrition and Food Research**, 2018.

POPKIN, Barry, Symposium: Obesity in developing countries: biological and ecological factors, **The Journal of Nutrition**, 2001.

Portal GTEx, disponível em: <<https://gtexportal.org/home/gene/APOB>>, acesso em: 15 set. 2020.

Portal GTEx, disponível em: <<https://gtexportal.org/home/gene/APOE>>, acesso em: 15 set. 2020.

Portal GTEx, disponível em: <<https://gtexportal.org/home/gene/LIPC>>, acesso em: 15 set. 2020.

RAMOS-LOPEZ et al, Guide for current nutrigenetic, nutrigenomic, and nutriepigenetic approaches for precision nutrition involving the prevention and management of chronic diseases associated with obesity, 2017

RAPOSO, Helena Fonseca, Efeito dos ácidos graxos n-3 e n-6 na expressão de genes do metabolismo de lipídeos e risco de aterosclerose, **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 5, p. 871–879, 2010.

REDDY VS, Palika R, Ismail A, Pullakhandam R, Reddy GB. Nutrigenômica: oportunidades e desafios para a nutrição em saúde pública. **Indian J Med Res**. 2018.

ROCHA, Naruna Pereira *et al*, Association between dietary pattern and cardiometabolic risk in children and adolescents: a systematic review, **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, 2017.

SCHWINGSHACKL, Lukas; HOFFMANN, Georg, Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: A systematic review and meta-analysis of cohort studies, **Lipids in Health and Disease**, 2014.

SOFI, Francesco *et al*, Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: An updated systematic review and meta-analysis, **American Journal of Clinical Nutrition**, 2010.

SUNDSETH, Kerstin; LTD, Ecosystems; BRUXELAS, Natura 2000 na Região Mediterrânica, 2010.

OGCE, Filiz *et al*, Comparison of Mediterranean, Western and Japanese diets and some recommendations, **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 2008.

Tissues- Tissue expression. Database. Disponível em:
https://tissues.jensenlab.org/Entity?figures=tissues_body_%&knowledge=10&experiments=10&textmining=10&homologs=10&type1=10090&type2=-25&id1=ENSMUSP00000036044, 2021.

Tissues- Tissue expression. Database. Disponível em:
https://tissues.jensenlab.org/Entity?figures=tissues_body_%&knowledge=10&experiments=10&textmining=10&homologs=10&type1=10090&type2=-25&id1=ENSMUSP000000133302, 2021.

Tissues- Tissue expression. Database. Disponível em:
https://tissues.jensenlab.org/Entity?figures=tissues_body_%&knowledge=10&experiments=10&textmining=10&homologs=10&type1=10090&type2=-25&id1=ENSMUSP00000034731, 2021.

TOKUDOME, S. *et al*, The Mediterranean vs the Japanese diet (multiple letters), **European Journal of Clinical Nutrition**, 2004.

VALENTE, Maria Anete Santana *et al*, Nutrigenômica/Nutrigenética Na Elucidação Das Doenças Crônicas, **HU Revista**, 2015.

VAN DEURSEN, Diederik *et al*, Activation of hepatic lipase expression by oleic acid: Possible Involvement of USF1, **Nutrients**, v. 1, n. 2, p. 133–147, 2009.

VASILOPOULOU, Dafni *et al*, Reformulation initiative for partial replacement of saturated with unsaturated fats in dairy foods attenuates the increase in LDL cholesterol and improves flow-mediated dilatation compared with conventional dairy: The randomized, controlled REplacement of SaturatEd fat in dairy on Total cholesterol (RESET) study, **American Journal of Clinical Nutrition**, 2020.

WALTON, Chase M. *et al*, Improvement in Glycemic and Lipid Profiles in Type 2 Diabetics with a 90-Day Ketogenic Diet, **Journal of diabetes research**, 2019.

WESTIN, Taciana *et al*, The influence of lipogenesis in the obesity in humans, **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, 2007.

WILLIAMS, Holden et. al., APOE alters glucose flux through central carbon pathways in astrocytes, **HSS Public Access**, 2019

ZHANG, Ronghua *et al*, The difference in nutrient intakes between Chinese and mediterranean, Japanese and american diets, **Nutrients**, 2015.

ZHU, Qibo *et al*, Comparison of the hypoglycemic effect of acarbose monotherapy in patients with type 2 diabetes mellitus consuming an eastern or western diet: A systematic meta-analysis, **Clinical Therapeutics**, 2013.

ANEXO

ANEXO 1: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (CEUA/BIO-UFPR)

08/06/2020

SEI/UFPR - 2640564 - CEUA/BIO: Certificado



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1337

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.082467/2019-18

APROVADO/APPROVAL: 18/02/2020 – R.O. 01/2020

TÍTULO: Investigação do efeito de compostos nutricionais bioativos sobre a suscetibilidade genética às dislipidemias em grupos populacionais com padrões alimentares ocidentais e orientais.

ANEXO 2: METODOLOGIA DESCRITIVA DOS PROCEDIMENTOS DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL

DESENVOLVIMENTO DO EXPERIMENTO

As 56 ratas foram retiradas do biotério com seis semanas de vida e foram alocadas em 16 caixas (41x34x18cm), forradas com maravalha. As ratas foram distribuídas em quatro grupos com 14 animais cada, a fim de formar os grupos experimentais WD, WDS, ED e EDS. Todos os animais ficaram acomodados no Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná durante as 14 semanas do experimento, com temperatura de 21 graus e ciclo claro/escuro de 12 horas.

Na primeira semana, para fins de aclimação, os animais foram alimentados *ad libitum* com a ração padrão utilizada no Biotério (Nuvilab), a qual já estavam habituados. A partir da segunda semana no Biotério, houve a substituição da ração padrão pelas rações manipuladas com padrões Ocidental e Oriental, de acordo com o grupo experimental. A quantidade de ração disponibilizada por rato por dia foi de 25g, adicionada nas caixas nos mesmos dias em que era realizada a limpeza delas. A quantidade de ração remanescente era pesada, a fim de se ter o controle do consumo diário por animal em gramas, para posterior cálculo do consumo. A água foi disponibilizada *ad libitum* e era trocada nos mesmos dias em que a limpeza era realizada.

Os animais dos grupos WDS e EDS, além da dieta específica, também receberam três doses semanais de azeite de oliva, totalizando 1,4mL semanais, aplicadas individualmente. Os animais dos grupos WD e ED receberam água na mesma quantidade e pelo mesmo método, com a finalidade de estarem sendo submetidos ao mesmo tipo de intervenção. As ratas eram pesadas uma vez por semana na balança disponibilizada pelo biotério.

EUTANÁSIA, COLETA DE SANGUE, FÍGADO E TECIDO ADIPOSEO

A eutanásia foi realizada com as ratas em jejum prévio de 12 horas, após 14 semanas de experimentação, quando os animais estavam com 20 semanas de vida. As ratas foram anestesiadas com uma dose intraperitoneal de 0,8ml de hidrato de cloral 15% administrado no quadrante inferior esquerdo do abdômen. Após o

anestésico fazer efeito (cerca de 15 minutos), os animais foram decapitados com o uso de uma guilhotina.

O sangue foi coletado diretamente do corpo após a decapitação, sendo vertido diretamente nos tubos de 0,5mL com gel separador de coágulo para análises dos triglicerídeos e colesterol, e tubos de 0,5mL com adição de fluoreto para dosagem de glicose. Imediatamente após a coleta do sangue, os tudo foram centrifugados 13000RPM por 20 minutos.

Em seguida, o corpo de cada animal foi aberto ventralmente com uma tesoura para que se pudesse acessar o fígado e o tecido adiposo visceral. Cerca de 0,4g do fígado foi coletado de cada animal com o auxílio de uma pinça reta e uma pinça curva, armazenado em tubos de microcentrífuga de 1,5ml com 400ul de *RNA lätter* (Thermo Fisher Scientific®) e acondicionado em uma caixa com gelo. Da mesma forma, foi coletado cerca de 0,6g de tecido adiposo visceral, que foi armazenado em tubos com 600ul de *RNA lätter*. Os tubos com os tecidos coletados foram armazenados a -80°C para posterior extração de RNA e retrotranscrição.

DOSAGENS BIOQUÍMICAS

As dosagens bioquímicas foram feitas utilizando o kit específico para animais da marca Labtest, de acordo com as especificações do fabricante. Para a dosagem de colesterol, triglicerídeos e glicose, utilizou-se 10µl de amostra para 1000µl de reagente, que foram incubados em banho maria por 10 minutos a 37°C. Após esse tempo, 200µL desse material foi pipetado em uma placa de 96 poços, em triplicata para cada amostra. O mesmo ocorreu para a realização da dosagem de reagente padrão fornecido pelo fabricante do teste, sendo 10µl de reagente padrão adicionado a 1000µl de reagente específico para cada reação e o controle negativo da reação possuía apenas os 1000µL de reagente. A leitura da absorbância foi realizada em 505nm no espectrofotômetro leitor de microplaca Synergy LX® (BioTex Instruments), em laboratório anexo ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

Após as medições realizadas no espectrofotômetro, foram realizados os cálculos das dosagens, de acordo com o fabricante, conforme o Quadro 1.

Quadro 1. Fórmulas utilizadas para cálculo das dosagens de triglicerídeos, colesterol e glicose.

Triglicerídeos (mg/dL)	=	$\frac{\text{absorbância do teste}}{\text{absorbância do padrão}}$	x 200
Colesterol (mg/dL)	=	$\frac{\text{absorbância do teste}}{\text{absorbância do padrão}}$	x 200
Glicose (mg/dL)	=	$\frac{\text{absorbância do teste}}{\text{absorbância do padrão}}$	x 100

ANÁLISE MOLECULAR

Extração de RNA e síntese de cDNA

Foi realizada a extração de RNA total de fígado e tecido adiposo utilizando o kit comercial PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies). Para o fígado, foi utilizado cerca de 0,05g de tecido por amostra, enquanto para o tecido adiposo, foi utilizado aproximadamente 0,15g de tecido por amostra. Essa diferença na quantidade de material inicial se deveu a alta quantidade de RNA total esperada no fígado e baixa quantidade de RNA total esperada no tecido adiposo, a fim de se recuperar uma quantidade maior de RNA total do tecido adiposo. Além disso, o RNA total recuperado do fígado foi eluído em 100µl enquanto do tecido adiposo foi eluído em 50µl da solução eluente proveniente o kit de extração.

Após a recuperação do RNA total das amostras, realizou-se a transcrição reversa dos ácidos nucléicos. Foi realizada a medição da concentração de RNA utilizando espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific). A partir das concentrações de RNA recuperadas em cada amostra foi realizado o tratamento com DNase I livre de RNase (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante, para 1000ng de RNA. Em seguida, foi realizado o tratamento com enzima inibidora de RNase em paralelo com a transcrição reversa do RNA total a fim de se obter o DNA complementar (cDNA), o qual foi realizado utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription® (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante.

Após a síntese de cDNA a partir do RNA total extraído de cada amostra, iniciou-se a análise da expressão dos genes de interesse por PCR quantitativa.

ESCOLHA DOS GENES-ALVO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Os alvos analisados neste trabalho foram os genes relacionados ao metabolismo de lipídeos que codificam as proteínas apoproteína B (gene *APOB*), apoproteína E (gene *APOE*), lipase hepática (gene *LIPC*) e lipase endotelial (gene *LIPG*). Estes genes-alvo foram selecionados com base na meta-análise desenvolvida por TEIXEIRA e colaboradores (no prelo), onde foi analisado o efeito conjunto de polimorfismos em genes do metabolismo dos lipídeos sob os níveis de lipídeos séricos de humanos ante padrões de dieta Ocidental e Oriental. Essa análise demonstrou que diferentes conjuntos de genes estão influenciando os níveis de lipídios nas populações orientais e ocidentais e, possivelmente, esses padrões distintos são devidos a interações adaptativas gene-dieta. Os genes *APOE* e *LIPC* apresentaram efeito semelhante sob o perfil lipídico ante ambas as dietas, enquanto os genes *APOB* e *LIPG* apresentaram efeito significativo somente sob a dieta oriental e ocidental, respectivamente.

Foram utilizados dois genes-referência para cada tecido, sendo os mesmos escolhidos especificamente para o fígado e tecido adiposo de ratos. Para o fígado foram utilizados os genes *RPLP1* e *HPRT1*, enquanto para o tecido adiposo foram utilizados os genes *B2M* e *HPRT1*. As sequências dos *primers* dos genes-alvo e genes-referência investigados neste trabalho estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências dos *primers* dos genes-alvo e genes-referência investigados neste trabalho.

GENE	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE
<i>APOB</i>	5'-GATGGAGATGGGAGATGAGGT-3'	5'-GGGCTCCTCATCAACAAGAG-3'
<i>APOE</i>	5'-TTGGTCCCATTGCTGACAG-3'	5'-ACCGTCAGTTCCTGTGTGAC-3'
<i>LIPC</i>	5'-GAACACAGTGCAGACCATAATGCT-3'	5'-TTCAGGTCACATTCACGAAGACTT-3'
<i>B2M</i>	5'-ATGGAGCTCTGAATCATCTGG-3'	5'-AGAAGATGGTGTGCTCATTGC-3'
<i>RPLP1</i>	5'-TAAGGCCGCCTTGAGGTG-3'	5'-GATCTTATCCTCCGTGACCGT-3'
<i>HPRT1</i>	5'-TAGCACCTCCTCCGCCAG-3'	5'-CACTAATCACGACGCTGGGA-3'

Os níveis de expressão gênica foram quantificados através do ensaio quantitativo por PCR em tempo real (aqui chamado de qPCR). O cDNA das amostras

foi diluído na proporção de 1:15 em água DEPC. Foram utilizados 5µl da amostra diluída para cada reação, além de 0,3µl de *primer reverse*, 0,3µl de *primer forward* e 4,4µl de SYBR Green Real-Time Master Mix® (Applied Biosystems). As reações de qPCR foram realizadas no termociclador Viiia 7™ Real Time PCR System (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 50°C por 2min, 95°C por 10min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos. Cada amostra foi testada em triplicada e a expressão relativa foi calculada pelo método $\Delta\Delta CT$ a partir do CT (*Threshold Cycle*) médio das triplicatas de cada amostra.

ANEXO 3: DESENHO DOS PRIMERS DOS GENES UTILIZADOS NESTE ESTUDO

Gene alvo: *APOB*

PRIMER FORWARD: 5'-GATGGAGATGGGAGATGAGGT-3'

PRIMER REVERSE: 5'- GGGCTCCTCATCAACAAGAG-3'

Gene alvo: *APOE*

PRIMER FORWARD 5'-TTGGTCCCATTGCTGACAG-3'

PRIMER REVERSE 5'-ACCGTCAGTTCCTGTGTGAC-3'

Gene alvo: *LIPC*

PRIMER FORWARD 5'-GAACACAGTGCAGACCATAATGCT-3'

PRIMER REVERSE 5'-TTCAGGTCACATTTACGAAGACTT-3'

Gene referência: *B2M*

PRIMER FORWARD 5'-ATGGAGCTCTGAATCATCTGG-3'

PRIMER REVERSE 5'-AGAAGATGGTGTGCTCATTGC-3'

Gene referência: *RPLP1*

PRIMER FORWARD 5'-TAAGGCCGCCTTGAGGTG-3'

PRIMER REVERSE 5'-GATCTTATCCTCCGTGACCGT-3'

Gene referência: *HPRT1*

PRIMER FORWARD 5'-TAGCACCTCCTCCGCCAG-3'

PRIMER REVERSE 5'-CACTAATCACGACGCTGGGA-3'