



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



Jaqueline Leite da Costa
Myliane Tsukimi Yokoyama Yasunaka

**Avaliação tecido-específica da bioconversão do ácido alfa-linolênico em EPA e
DHA em camundongos.**

Limeira, SP
2022



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



Jaqueline Leite da Costa
Myliane Tsukimi Yokoyama Yasunaka

**Avaliação tecido-específica da bioconversão do ácido alfa-linolênico em EPA e
DHA em camundongos.**

Trabalho de
Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial para a
obtenção do título de Nutricionista à
Faculdade de Ciências Aplicadas da
Universidade Estadual de Campinas.

Orientador: Prof. Dr. Dennys Esper Cintra

Limeira, SP
2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Ana Luiza Clemente de Abreu Valério - CRB 8/10669

C823a Costa, Jaqueline Leite da, 1996-
Avaliação tecido-específica da bioconversão do ácido alfa-linolênico em EPA e DHA em camundongos / Jaqueline Leite da Costa, Myliane Tsukimi Yokoyama Yasunaka. – Limeira, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Dennys Esper Cintra.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Ácidos graxos Ômega-3. 2. Expressão gênica. I. Cintra, Dennys Esper, 1976-. II. Yasunaka, Myliane Tsukimi Yokoyama, 1998-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Palavras-chave em inglês:

Omega-3 fatty acids

Gene expression

Titulação: Bacharel em Nutrição

Banca examinadora:

Susana Castelo Branco Ramos Nakandakari

Data de entrega do trabalho definitivo: 13-07-2022

Autores: Jaqueline Leite da Costa, Myliane Tsukimi Yokoyama Yasunaka

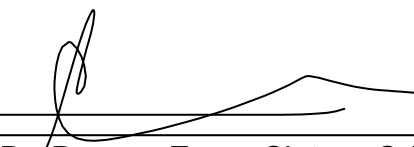
Título: Avaliação tecido-específica da bioconversão do ácido alfa-linolênico em EPA e DHA em camundongos.

Natureza: Trabalho de Conclusão de Curso em Nutrição

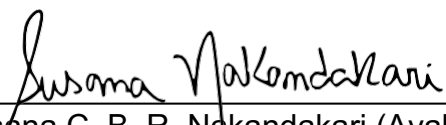
Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

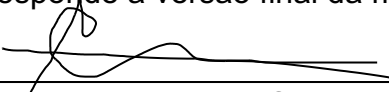


Prof. Dr. Dennys Esper Cintra - Orientador
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA UNICAMP)



Susana C. B. R. Nakandakari (Avaliador)
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA UNICAMP)

Esse exemplar corresponde à versão final da monografia aprovado



Prof. Dr. Dennys Esper Cintra - Orientador
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA UNICAMP)

COSTA, Jaqueline Leite; YASUNAKA, Myliane Tsukimi Yokoyama. Avaliação tecido-específica da bioconversão do ácido alfa-linolênico em EPA e DHA em camundongos. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Faculdade de Ciências Aplicadas. Universidade Estadual. Limeira. 2022.

RESUMO

Os ácidos graxos da família ômega-3 (ω 3) são essenciais, e devem ser consumidos diretamente de suas fontes alimentares. O ácido graxo alfa-linolênico (ALA - C18:3) pode ser encontrado em abundância nos óleos vegetais das sementes de linhaça e chia, enquanto os ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA - C20:5) e docosahexaenóico (DHA - C22:6) são encontrados em óleos extraídos de fontes marinhas, como algas, peixes e crustáceos. Apesar de ser possível a bioconversão endógena de ALA às espécies alongadas de EPA e DHA, esse processo é limitado. As enzimas delta-5 e 6 dessaturases e elongase 2 e 5 codificadas pelos genes *FADS1*, *FADS2*, *ELOVL2* e *ELOVL5*, respectivamente, são as responsáveis pelo processo de bioconversão de ALA em EPA e DHA. Contudo, é possível que essas enzimas sejam coordenadas de forma tecido-dependente. Para isso, foi oferecido o óleo da semente de linhaça (rico em ALA) a animais experimentais, que tiveram diversos tecidos coletados após tempos específicos do tratamento. Posteriormente, os tecidos foram submetidos a dois tipos de análises: Análise de incorporação tecidual do ALA e bioconversão a EPA e DHA por espectrometria de massas; Análise do padrão de expressão gênica das enzimas *Fads1*, *Fads2*, *Elovl2* e *Elovl5* nos tecidos alvo.

Palavras-chave: Ômega-3; ALA; EPA; DHA; Biodisponibilidade; FADS.

COSTA, Jaqueline Leite; YASUNAKA, Myliane Tsukimi Yokoyama. Avaliação tecido-específica da bioconversão do ácido alfa-linolênico em EPA e DHA em camundongos. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Faculdade de Ciências Aplicadas. Universidade Estadual. Limeira. 2022.

ABSTRACT

Omega-3 (ω 3) family fatty acids are essential, and must be consumed directly from their dietary sources. Alpha-linolenic fatty acid (ALA - C18:3) can be found in abundance in vegetable oils from flaxseed and chia seeds, while eicosapentaenoic (EPA - C20:5) and docosahexaenoic (DHA - C22:6) fatty acids are found in oils extracted from marine sources such as algae, fish and crustaceans. Although the endogenous bioconversion of ALA to the elongated species of EPA and DHA is possible, this process is limited. The enzymes delta-5 and 6 desaturases and elongase 2 and 5 encoded by the genes *FADS1*, *FADS2*, *ELOVL2* and *ELOVL5*, respectively, are responsible for the process of bioconversion of ALA into EPA and DHA. However, it is possible that these enzymes are coordinated in a tissue-dependent manner. For this, flaxseed oil (rich in ALA) was offered to experimental animals, which had several tissues collected after specific treatment times. Subsequently, the tissues were submitted to two types of analysis: Analysis of tissue incorporation of ALA and bioconversion to EPA and DHA by mass spectrometry; Analysis of the gene expression pattern of *Fads1*, *Fads2*, *Elov12* and *Elov15* enzymes in target tissues.

Keywords: Ômega-3; ALA; EPA; DHA; Bioavailability; FADS, ELOVL.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO-----	7
2. OBJETIVOS-----	8
2.1. OBJETIVO GERAIS-----	8
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO-----	9
3. MÉTODOS-----	9
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS-----	9
3.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS-----	9
3.3. ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA POR REAL TIME – QPCR-----	10
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA-----	10
4. RESULTADOS-----	11
4.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE LINHAÇA UTILIZADO NA GAVAGEM DOS CAMUNDONGOS.-----	11
4.2. ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS-----	12
4.2.1. ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS OBTIDOS DO SORO-----	12
4.2.2. ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS OBTIDOS DO FÍGADO-----	13
4.2.3. ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS OBTIDOS DOS TESTÍCULOS-----	14
4.2.4. ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS OBTIDOS DO MÚSCULO-----	15
4.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS <i>FADS1</i> , <i>FADS2</i> , <i>ELOVL2</i> E <i>ELOVL5</i> -----	16
4.3.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS <i>FADS1</i> , <i>FADS2</i> , <i>ELOVL2</i> E <i>ELOVL5</i> OBTIDAS DO FÍGADO-----	16
4.3.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS <i>FADS1</i> , <i>FADS2</i> , <i>ELOVL2</i> E <i>ELOVL5</i> OBTIDAS DO TESTÍCULO-----	16
4.3.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS <i>FADS1</i> , <i>FADS2</i> , <i>ELOVL2</i> E <i>ELOVL5</i> OBTIDAS DO MÚSCULO-----	17
5. DISCUSSÃO-----	17
6. CONCLUSÃO-----	20
7. REFERÊNCIAS-----	21

1. INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos da família do ômega-3 (ω 3), como o alfa-linolênico (ALA - C18:3), eicosapentaenóico (EPA - C20:5), docosapentanoico (DPA – C22:5) e o docosahexaenóico (DHA - C22:6) são essenciais aos seres humanos, por formarem os fosfolipídios que são componentes das membranas celulares, pela formação da bainha de mielina, participarem da gametogênese e da produção de mediadores celulares como as prostaglandinas, entre diversas outras funções vitais^{5,9}. Apesar da imensa funcionalidade, não são sintetizados no organismo de mamíferos, devendo ser adquiridos via alimentação. A bioconversão endógena de ácido oleico (18:1) a ALA é limitada nos humanos, pela ausência da enzima chave no processo, a Δ -15 dessaturase^{9,17}.

O ácido graxo ALA é predominantemente encontrado em vegetais, sendo abundante nos óleos da semente de linhaça, chia, e em quantidades menores, mas significantes, nos óleos de canola e soja¹. Apesar de serem fontes exuberantes em ALA, novamente, mamíferos são parcialmente limitados em sua derivação para espécies mais longas, como o EPA e DHA. Assim, são espécies de ácidos graxos que também devem ser adquiridos pela alimentação, em fontes alimentares como óleos e vísceras de peixes marinhos, preferencialmente oriundos de águas frias e profundas¹⁸.

De acordo com a literatura científica, as taxas de bioconversão podem ser muito variáveis em humanos. Um trabalho conduzido por Emkem et al., em humanos foi encontrada uma razão de conversão de ALA a EPA de até 18,5%, enquanto Goyens et al., utilizaram no estudo ALA radioativamente marcado, identificaram que essa conversão não passou de 7%^{7,9}. Outro estudo, cujo grupo investigado foi de mulheres em idade reprodutiva, mostrou maiores taxas de conversão de ALA em EPA e DHA, a partir da análise de dosagens controladas de ALA oferecidas às voluntárias foi identificado que as conversões chegaram a 21% em EPA e 9% em DHA⁴. Assim, apesar das incongruências nos trabalhos científicos sobre a real taxa de bioconversão de ALA às suas espécies mais longas, tem-se que essa bioconversão é baixa, reforçando ainda mais a necessidade de busca desses lipídios através das fontes marinhas.

Em geral, trabalhos que avaliam a taxa de bioconversão dessas espécies de $\omega 3$ mostram isso no sangue^{3,7,9}. Apesar disso, sabe-se que os hepatócitos são células de grande habilidade na bioconversão do ácido graxo ALA à EPA e DHA¹. Contudo, é possível que cada tipo celular em específico apresente capacidade exclusiva de bioconversão, de acordo com a própria necessidade tecidual. A bioconversão de ALA a partir de enzimas como as Δ -5 e Δ -6 dessaturases, respectivamente codificadas pelos genes *FADS1* e *FADS2*, possuem função de formar duplas ligações através da oxidação de carbonos. Além disso, é necessária a participação das enzimas elongases que são responsáveis por adicionar dois átomos de carbono à cadeia e codificadas pelos genes *ELOVL 2* e *ELOVL 5*^{17,22}. Sendo essas enzimas determinantes para o processo de bioconversão de ALA, é possível que cada tecido as produza em quantidade suficiente para o próprio uso de EPA e DHA.

Ainda, Simopoulos (2016), sugere que a ingestão alimentar de $\omega 3$ esteja em equilíbrio proporcional à quantidade de $\omega 6$, 5:1 ($\omega 6:\omega 3$), uma vez que o $\omega 6$ compete com $\omega 3$ pela ação das enzimas *FADS1* e *FADS2*¹⁷. Muitos trabalhos focam nessa proporção estabelecida de consumo (5:1 - $\omega 6:\omega 3$), entretanto, estes valores são sugeridos como razão de funcionalidade caracterizado como ótimo funcionamento para taxa sanguínea. Mas dados experimentais do nosso grupo apontam para a capacidade que cada tecido biológico possui em bioconverter ALA a EPA e DHA à sua própria necessidade. Associada à grande variação na literatura, entre as taxas de bioconversão analisadas a partir do sangue, a hipótese do trabalho visa compreender a bioconversão desses ácidos graxos de forma tecido-específico. Portanto o objetivo é avaliar a taxa de bioconversão do ácido alfa-linolênico em EPA e DHA em camundongos saudáveis, juntamente à avaliação do padrão de expressão gênica e conteúdo proteico das enzimas *Fads1*, *Fads2*, *Elovl2* e *Elovl5* em tecidos como o fígado, testículos e músculo esquelético gastrocnêmio.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo gerais

Avaliação tecido-específica da bioconversão do ácido alfa-linolênico em EPA e DHA em camundongos saudáveis.

2.2. Objetivo específico

1 - Avaliar o perfil de ácidos graxos em tecidos de camundongos gavados com fonte de ω 3 de origem vegetal.

2 - Mensurar a bioconversão de ALA em EPA e DHA de forma tecido-específico.

3 - Avaliar o padrão de expressão gênica das enzimas Fads1, Fads2, Elovl2 e Elovl5 nos tecidos de maior e menor bioconversão.

3. MÉTODOS

3.1. Animais experimentais

Esse projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA – UNICAMP). Camundongos C57BL/6J machos, com quatro semanas de idade, provenientes do Biotério Central da UNICAMP (CEMIB) foram pesados e, a partir do peso, distribuídos randomicamente em 6 grupos, com 4 animais em cada. Foram mantidos em ração comercial e água *ad libitum* à vontade. Foram submetidos a uma semana de adaptação e alocados no biotério do LabGeN, em condições de luz (ciclo claro/escuro 12h/12h) e temperatura (22 °C $\pm$ 2) controladas. No dia do experimento os animais foram mantidos em jejum alimentar por 8 horas. Posteriormente, foi administrado aos animais, via gavagem, 0,5 mL de óleo de semente de linhaça (OL), fonte de ômega-3 – ALA (52%). Após administração anestésica (cetamina 300 mg/kg e xilazina 30 mg/kg) e perda dos reflexos pedais e corneais, os animais do grupo 1 foram eutanasiados imediatamente após gavagem com soro fisiológico, sendo considerados como grupo controle. Os demais grupos foram eutanasiados após 2 (grupo 2), 4 (grupo 3), 8 (grupo 4), 16 (grupo 5) e 24 (grupo 6) horas após gavagem com óleo de linhaça. Após a eutanásia, foram coletados o sangue e fragmentos de tecidos como fígado, músculo esquelético gastrocnêmio, testículos.

3.2. Espectrometria de Massas

Para análise do perfil completo de ácidos graxos incorporados nos tecidos alvo desta investigação, os materiais biológicos foram submetidos a processos

específicos de metilação. As amostras de sangue foram diretamente metiladas utilizando o método proposto por Shirai e colaboradores¹⁹. Os fragmentos de fígado, músculo esquelético gastrocnêmio, testículos foram submetidos ao processo de extração lipídica, de acordo com método proposto por Folch⁸. Posteriormente, os lipídios obtidos foram saponificados e esterificados de acordo com a metodologia de Hartman e colaboradores¹¹. Por fim, todos os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foram analisados em cromatógrafo a gás, acoplado ao espectrômetro de massas (GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu®). As condições do espectrômetro de massas foram de: voltagem de ionização, 70eV; temperatura da fonte do íon, 200 °C; modo de varredura completa nos intervalos de massa entre 35-500 com 0,2s/varredura de velocidade.

3.3. Análises de expressão gênica por Real Time – qPCR

Fragmentos do fígado, músculo esquelético gastrocnêmio e testículos foram homogeneizados em Purezol®. O RNA total foi isolado de acordo com as recomendações do fabricante. Uma alíquota de RNA total foi utilizada para a síntese de cDNA, com sistema de pré-amplificação pelo Kit High Capacity. O desenho dos primers utilizados foram:

	Forward	Reverse
Fads1	TGAACCCACCA AGAATAAAGCG	AAGAAGAGGTGGTT GGCCTT
Fads2	TCATCCTCTCGT ACTTCGGC	GGTGGCCATAGTCA TGTTGC
Elovl5	CTTCCTCTTGCA TCGCGG	ATGTTCCATTTTAAA ACCTCTCTGC
Elovl2	GTGATGTCCGG GTAGCCAA	ATGGACGCGTGGTG ATAGAC

3.4. Análise Estatística

As variáveis em estudo foram submetidas ao teste de Shapiro-wilk para verificação da normalidade. Para variáveis com distribuição normal, foi utilizado

o teste “*t*” de Student para comparação de duas amostras independentes. O nível de significância adotado foi o de 5% ($p < 0,05$). Para as variáveis que não seguiram a distribuição normal, utilizou-se o teste Mann-Whitney para a comparação de duas amostras independentes, com o mesmo nível de significância adotado anteriormente.

4. RESULTADOS

4.1. Composição química de ácidos graxos do óleo de linhaça utilizado na gavagem dos camundongos.

A Tabela 1 mostra a composição do óleo de linhaça utilizado na gavagem dos camundongos. A gavagem foi realizada com 0,5 mL, a fim de que o estômago do animal atingisse seu volume máximo¹⁵.

Composto	%
C14:0	0,06
C15:0	0,04
C16:0	5,73
C16:1	0,08
C17:0	0,06
C17:1	0,04
C18:0	4,61
C18:1	22,22
C18:2	13,90
C18:3 <i>t</i>	0,20
C18:3 - ALA	52,39
C20:0	0,17
C20:1	0,15
C22:0	0,16
C24:0	0,17

Tabela 1. Composição do óleo de linhaça utilizado na gavagem dos camundongos.

4.2. Análise do perfil de ácidos graxos

4.2.1. Análise do perfil de ácidos graxos obtidos do soro

A Figura 1 representa o perfil lipídico encontrado no soro dos animais experimentais. O Gráfico A mostra que a curva do ácido linolênico (ALA) partiu de uma concentração muito baixa e atingiu seu maior pico no tempo de quatro horas, o que representa a absorção de ALA até atingir seu platô. Por fim, observa-se o decaimento da curva à medida em que ele começa a ser utilizado pelo organismo após 4 horas. No Gráfico B, observa-se que os ácidos graxos EPA e DHA tiveram pequeno incremento entre os tempos de duas e quatro horas, o que indica que eles podem ter sido influenciados pela curva de crescimento do ALA, conforme sua absorção. Portanto, presume-se a possível biotransformação do ALA, em EPA e DHA, espécies de cadeia mais longas de ácidos graxos.



Figura 1. Perfil de ácidos graxos do soro de camundongos tratados com óleo de linhaça. Análise do perfil de ácidos graxos $\omega 3$ presentes no soro de camundongos tratados com 0,5 mL de óleo de linhaça, nos tempos 0h, 2h, 4h, 8h, 16h e 24h. A. Os valores de ALA (Gráfico A) foram destacados dos valores de EPA e DHA (Gráfico B) para melhorar a visualização da definição do comportamento cinético desses, dada a robusta diferença na concentração do ALA. Valores expressos em $\mu\text{g/mL}$. ALA – ácido α -linolênico; EPA – ácido eicosapentaenoico; DHA – ácido docosahexaenoico.

4.2.2. Análise do perfil de ácidos graxos obtidos do fígado

A Figura 2 mostra o perfil lipídico encontrado no fígado dos animais dos seis grupos experimentais. Pode-se notar que o ALA apresenta pequeno aumento em sua concentração após oito horas da realização da gavagem. Entretanto, os demais ácidos graxos de cadeia mais longa da família $\omega 3$ apresentaram aumento gradativo desde o início da gavagem, mais uma vez fortalecendo a hipótese de que ocorre a biotransformação neste tecido. Com base nos dados obtidos, acredita-se que o ALA possa estar sendo rapidamente bioconvertido nessas espécies mais longas, o que justifica sua identificação, em pequena escala, nesse tecido. O EPA apresentou comportamento cinético regular, com início em duas horas e pico em 16 horas, seguido de seu decaimento. O DPA é um ácido graxo de baixa detecção nos tecidos, devido à concentração normalmente diminuída, associado à rápida bioconversão à DHA. O DHA, um ácido graxo essencial e comum no tecido hepático, apresentou aumento importante ao longo dos períodos analisados.

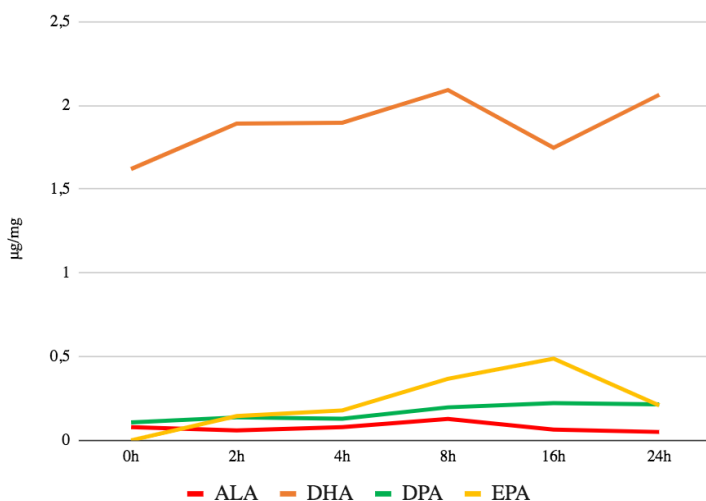


Figura 2: Perfil de ácidos graxos do fígado de camundongos tratados com óleo de linhaça. Análise do perfil de ácidos graxos $\omega 3$ presentes no fígado de camundongos após tratamento com 0,5 mL de óleo de linhaça, nos tempos 0h, 2h, 4h, 8h, 16h e 24h. Valores expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$. ALA – ácido α -linolênico; DHA – ácido docosahexaenoico; DPA – ácido docosapentaenoico; EPA – ácido eicosapentaenoico;

4.2.3. Análise do perfil de ácidos graxos obtidos dos testículos

A Figura 3 mostra o perfil lipídico encontrado nos testículos dos animais dos seis grupos experimentais. Ao contrário dos outros tecidos que tiveram diversas espécies de $\omega 3$ detectadas, apenas ALA e DHA foram detectados nos testículos dos camundongos. A curva do ALA apresentou padrão comportamental de acordo com o esperado e similar ao observado nas amostras de soro. Dessa forma, partindo de uma concentração muito baixa, o ALA atingiu seu máximo em duas horas, mantendo-se assim até quatro horas, com decaimento subsequente. O DHA acompanhou o comportamento do ALA, com pico de concentração em quatro horas.

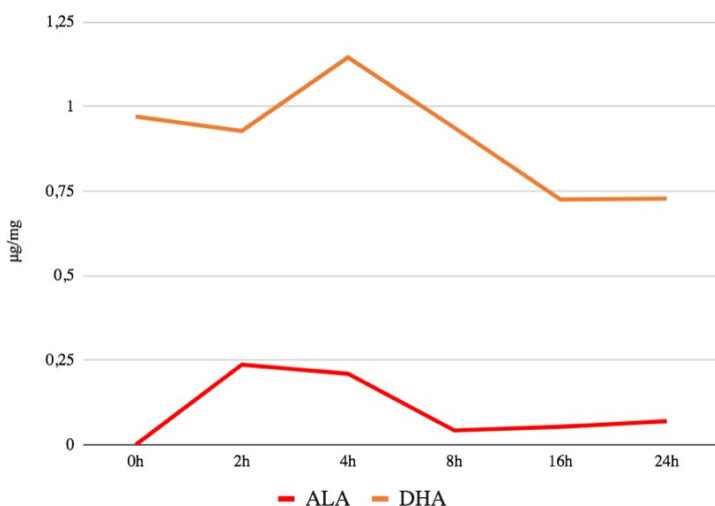


Figura 3: Perfil de ácidos graxos dos testículos de camundongos tratados com óleo de linhaça. Análise do perfil de ácidos graxos $\omega 3$ presentes nos testículos de camundongos após tratamento com 0,5 mL de óleo de linhaça, nos tempos 0h, 2h, 4h, 8h, 16h e 24h. Valores expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$. ALA – ácido α -linolênico; e DHA – ácido docosahexaenoico.

4.2.4. Análise do perfil de ácidos graxos obtidos do músculo esquelético gastrocnêmio

A Figura 4 mostra o perfil lipídico encontrado no músculo dos animais, dos seis grupos experimentais. Os lipídios observados no músculo foram os mesmos do soro. O ALA atingiu seu maior pico no período de duas horas e, logo após, decaiu entre quatro horas e oito horas até atingir concentração próxima a zero, permanecendo assim até o final da detecção. O DHA foi observado em elevada concentração desde o início, seguindo o padrão semelhante ao do soro, fígado e testículo, até mesmo mantendo comportamento irregular ao longo das horas. Já o DPA se mostrou bastante linear ao longo das horas, com sutil aumento em 16 horas e também sutil queda após esse período.

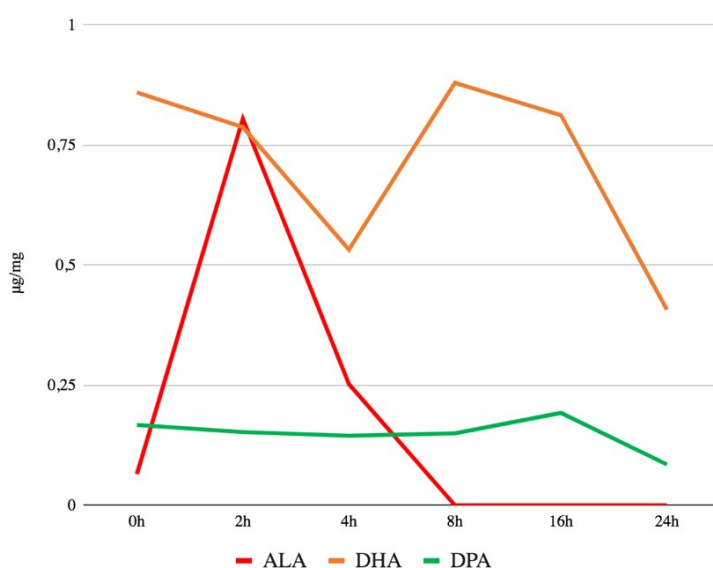


Figura 4: Perfil de ácidos graxos do músculo de camundongos tratados com óleo de linhaça. Análise do perfil de ácidos graxos $\omega 3$ presentes no músculo de camundongos após tratamento com 0,5 mL de óleo de linhaça, nos tempos 0h, 2h, 4h, 8h, 16h e 24h. Valores expressos em $\mu\text{g/mg}$. ALA – ácido α -linolênico; DHA – ácido docosahexaenoico; DPA – ácido docosapentaenoico

4.3. Análise da expressão gênica das enzimas *Fads1*, *Fads2*, *Elovl2* e *Elovl5*

4.3.1. Análise da expressão gênica das enzimas *Fads1*, *Fads2*, *Elovl2* e *Elovl5* obtidas do fígado

Para análise da expressão gênica das enzimas envolvidas nos processos de alongação (elongases *Elovl 2/5*) e de dessaturação (dessaturases *Fads 1/2*) adotou-se os tempos zero e oito horas, devido oito horas ter sido o pico máximo de apresentação para a maioria dos ácidos graxos testados. Assim, presumiu-se que esse seria o tempo adequado para avaliação do fenômeno de alteração em sua expressão.

Apenas as enzimas *Fads1* e *Elovl5* apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) após oito horas, quando comparadas ao tempo zero. Ambas as enzimas apresentaram diminuição no padrão de expressão gênica (Figuras 5 A e D).

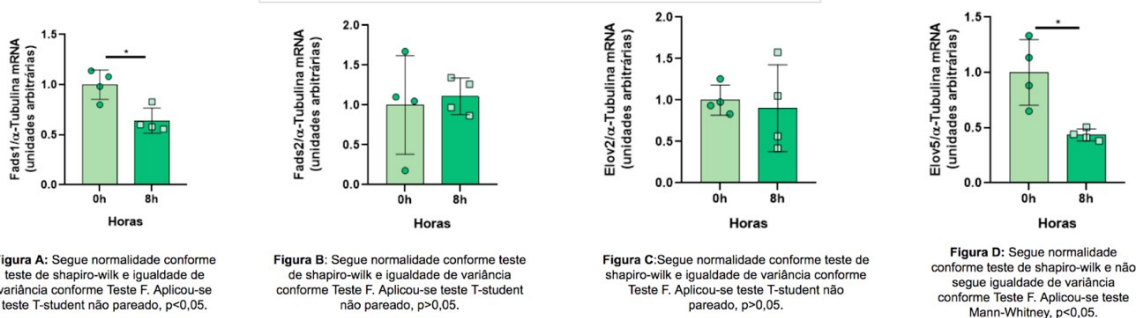


Figura 5: Expressão dos genes das enzimas *Fads1*, *Fads2*, *Elovl2* e *Elovl5*. A figura mostra a concentração das enzimas decodificadas pelos genes FADS1 (Figura 5A), FADS2 (Figura 5B), ELOVL2 (Figura 5C) e ELOVL5 (Figura 5d) encontradas no fígado de camundongos; detecção por meio de RT-qPCR.

4.3.2. Análise da expressão gênica das enzimas *Fads1*, *Fads2*, *Elovl2* e *Elovl5* obtidas do testículo

A análise da expressão gênica das enzimas no testículo dos camundongos, apresentou padrão semelhante de comportamento ao observado no fígado. Houve redução significativa ($p < 0,05$) na expressão dos genes *FADS1* e *ELOVL5* após oito horas, quando comparado ao tempo zero (Figuras 7 A e D).

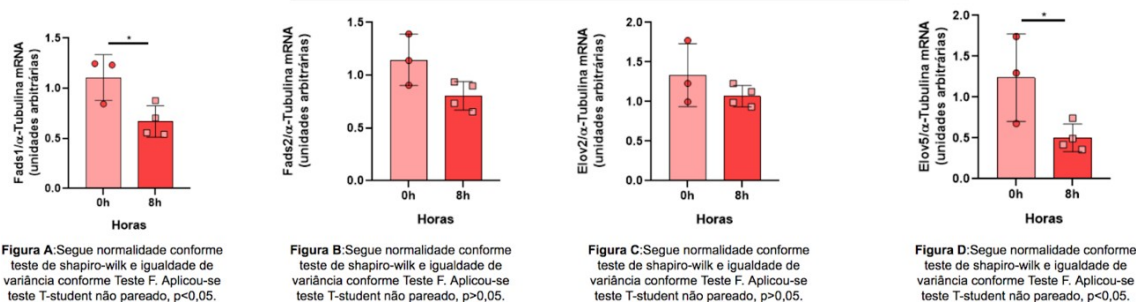


Figura 6: Expressão dos genes das enzimas *Fads1*, *Fads2*, *Elovl2* e *Elovl5*. A figura mostra a concentração das enzimas decodificadas pelos genes FADS 1 (Figura 6A), FADS 2 (Figura 6B), ELOVL2 (Figura 6C) e ELOVL5 (Figura 6D) encontradas no testículo de camundongos; detecção por meio de RT-qPCR.

4.3.3. Análise da expressão gênica das enzimas *Fads1*, *Fads2*, *Elovl2* e *Elovl5* obtidas do músculo

De forma singular no músculo, apenas a expressão gênica da enzima *Elovl5* apresentou redução significativa ($p < 0,05$) após oito horas de tratamento, quando comparado ao tempo zero (Figura 7D).

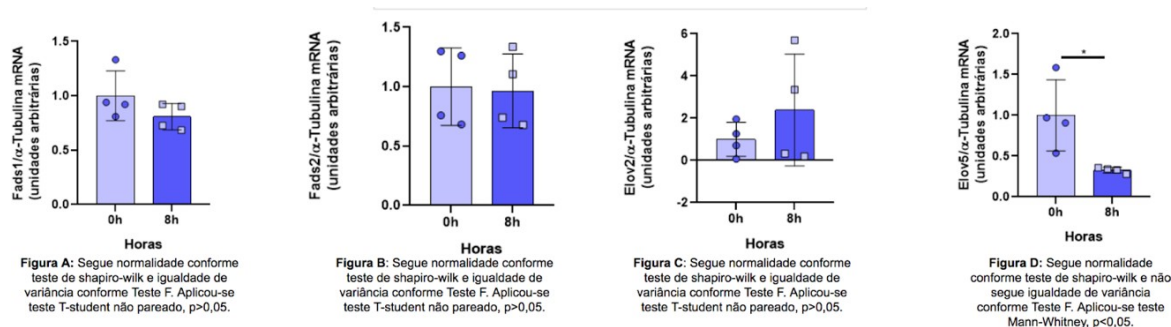


Figura 7: Expressão dos genes das enzimas *Fads1*, *Fads2*, *Elovl2* e *Elovl5*. A figura mostra a concentração das enzimas decodificadas pelos genes FADS1 (Figura 7A), FADS2 (Figura 8B), ELOVL2 (Figura 8C) e ELOVL5 (Figura 8D) no músculo de camundongos; detecção por meio de RT-qPCR.

5. DISCUSSÃO

Existe na literatura uma incongruência acerca das taxas de bioconversão do ácido α -linolênico às espécies mais longas de $\omega 3$, mensuradas no sangue. A eficiência de conversão de ALA em EPA e DPA é muito baixa e variável, com eficiência ainda menor em relação ao DHA. Outro fator que se discute é a

utilização do sangue como balizador do metabolismo dos ácidos graxos poliinsaturados, embora a conversão ocorra nos tecidos⁵.

No presente estudo, após administração do óleo de linhaça aos animais experimentais, após 2 horas foi observado aumento da quantidade sérica de ALA, o que mostra sua chegada ao sangue com sucesso. Em paralelo, observa-se também a elevação da concentração de EPA e DHA, ao longo do tempo, como possível resultado da bioconversão nos tecidos. Jacometo et al (2014) encontraram aumento significativo de ALA, EPA e DHA no sangue de ratos alimentados com uma dieta rica em óleo de linhaça durante 30 dias, esse aumento das espécies longas de $\omega 3$ não foi encontrado no grupo controle submetido a uma dieta abundante em óleo de soja¹³. Resultado parecido foi encontrado por Tarpila et al (2002) que analisaram o efeito do consumo de um alimento suplementado com óleo de linhaça e semente de linhaça moída nos lipídios séricos de 83 indivíduos, homens e mulheres. A ingestão da preparação enriquecida com linhaça promoveu o aumento significativo de ALA, EPA e DPA nos lipídios séricos, entretanto este efeito não foi significativo sobre a concentração de DHA². Diante disso, nossos resultados parecem estar alinhados com as informações encontradas na literatura.

No fígado, todos os quatro tipos principais de $\omega 3$ foram detectados, certamente por ser o tecido de maior eficiência na síntese ou oxidação dessas gorduras². Além disso, no fígado é onde ocorre a expressão mais relevante dos genes codificadores das enzimas responsáveis pela dessaturação (FADS) ou alongação (ELOVL) dos PUFAs^{2,14}. A análise da expressão gênica realizada no fígado mostrou que *Fads1* e *Elovl5* foram expressas de maneira reduzida no tempo de oito horas se comparada com o tempo zero. Essas duas enzimas são essenciais para a conversão de ALA em EPA, resultado que foi mostrado no fígado, a partir do comportamento cinético regular do EPA que aumentou entre duas horas até atingir seu maior pico em 16 horas. A redução da expressão dos genes das enzimas *Fads1* e *Elovl5* entre zero e oito horas pode ser explicada pela regulação por feedback negativo, na qual a expressão foi suprimida devido ao aumento do oferecimento de ALA via dieta, o que também foi visto por Igarashi et al (2007). Neste estudo foi observado que ratos alimentados durante 15 semanas com uma dieta deficiente em ALA tiveram o aumento da expressão hepática da D6D, D5D, elongases 2 e 5 em comparação aos ratos que foram alimentados com uma dieta com o conteúdo adequado de ALA¹².

Matsuzaka et al (2002) analisaram a relação entre estado energético e a atividade das dessaturases associado aos fatores de transcrição SREBP - 1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1a - Fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol) e o PPAR- α (Peroxisome proliferator activated receptor α - Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa) expressos no fígado de camundongos. No estado alimentado o SREBP - 1c ativa as dessaturases para a conversão de ALA em EPA e DHA, enquanto que os PUFA's produzidos são capazes de inativar a transcrição de SREBP - 1c. Já durante o jejum os PUFA's provenientes da lipólise do tecido adiposo que entram no fígado para a β -oxidação, além de serem substratos das enzimas de dessaturação e elongação, também são ligantes do PPAR α que ativa as dessaturases para realizarem a bioconversão de ALA em EPA e DHA. Dessa forma, essa dupla regulação é essencial para a produção de PUFA's que são indispensáveis para as funções celulares independentemente do estado de energia¹⁴.

Diante da relevância do ω 3 no fígado, o testículo é outro tecido onde esse nutriente é indispensável para que a reprodução ocorra, dado que o ω 3 compõe a membrana plasmática das células germinativas masculinas, contribuindo para a fluidez e velocidade dos espermatozoides²⁴. Assim, esse tecido foi escolhido para ser analisado e o perfil de ácidos graxos obtidos mostrou a presença de um único ácido graxo poliinsaturado, o DHA. Mesmo com a baixa identificação de PUFA's, a expressão gênica seguiu o padrão de regulação por feedback negativo, isto é, a concentração das *Elovl5* e *Fads1* diminuiu no tempo de oito horas, conforme o ALA foi sendo bioconvertido no testículo. Apesar do fígado receber grande atenção como local de biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados, a literatura mostra que os testículos também apresentam elevada expressão dos genes responsáveis pela codificação das elongases e dessaturases².

Casteline et al (2002) analisaram a expressão dos genes das enzimas *Fads1*, *Fads2*, *Elovl2* e *Elovl5* e o perfil de ácidos graxos poliinsaturados no testículo de coelhos suplementados com óleo de linhaça por 110 dias. No testículo dos coelhos que receberam a suplementação foi observada uma concentração maior de DHA em comparação ao grupo controle que não recebeu o óleo de linhaça. Os dois grupos mostraram concentrações quase inexpressivas de EPA e DPA, resultado similar ao nosso estudo, no qual foi verificado apenas o DHA no perfil de ácidos graxos do testículo. Neste mesmo trabalho realizado com coelhos foi observada uma alta

expressão dos genes das enzimas dessaturases e elongases, independentemente do tipo de dieta administrada. Entretanto, no grupo suplementado com óleo de linhaça verificou-se uma redução da expressão da *Elovl5* em comparação ao grupo controle, o mesmo comportamento de regulação por feedback negativo também foi observado na expressão dos genes do testículo do nosso estudo⁶.

O outro tecido escolhido para a investigação foi o tecido muscular dado que o interesse pelo $\omega 3$ como suplemento ergogênico tem aumentado, apesar de ainda não haver comprovação científica de sua utilização, atualmente a relação desse nutriente com a melhora do desempenho esportivo tornou-se bastante estudada devido aos supostos benefícios que seu uso poderia trazer, como favorecer a hipertrofia e a força muscular, além de proteger o músculo contra danos musculares ocasionados pela inflamação natural promovida durante o exercício^{4,20,21}. A análise do perfil dos ácidos graxos obtidos no músculo identificou o DPA e o DHA, já a análise da expressão gênica das enzimas dessaturases não foi observada a expressão reduzida entre os tempos zero e oito horas das enzimas *Fads1* e *Fads2*, dado que a D6D é essencial para a biotransformação de ALA em DHA. Diante disso, possivelmente o ALA foi incorporado ao tecido, mas não foi biotransformado em PUFA's. Apesar da elongase 5 ter seguido o padrão de feedback negativo, a concentração de DPA se manteve constante ao longo dos períodos analisados, uma possibilidade é que o ALA tenha sido incorporado e utilizado como fonte energética². Hang S et al (2016) analisaram a expressão gênica das enzimas D5D e D6D no músculo esquelético e em outros tecidos de camundongos, foi observado que o RNAm das enzimas no músculo foi muito menor que a expressão no fígado e cérebro, o que sugere uma capacidade sintética limitada no tecido¹⁰. Essa limitação de bioconversão sugerida por Hang S et al relaciona-se com a não observação de bioconversão de ALA em espécies mais longas a partir da análise cromatográfica do músculo em nossos resultados.

6. CONCLUSÃO

Nossos dados ressaltam a necessidade da aplicação de novas formas avaliativas da bioconversão do ALA em espécies mais longas, isso porque as taxas sanguíneas demonstram o resultado da conversão e utilização que ocorrem nos tecidos. Os resultados dessa pesquisa mostraram a singularidade de cada tecido

analisado quanto à bioconversão de ALA em EPA e DHA podendo depender ou não da ingestão do ômega-3, ou até mesmo ter uma grande expressão de enzimas alongases e dessaturases pode não ser uma certeza de ocorrer a bioconversão.

Além disso, foram observadas diferenças na composição dos ácidos graxos poliinsaturados em cada tecido e na expressão dos genes das enzimas de dessaturação e alongação, possivelmente reguladas pelo mecanismo de feedback negativo. Nossos resultados a respeito das diferenças entre as taxas de bioconversão de acordo com o tecido são reforçados pela literatura. Entretanto, são necessários mais estudos a fim de compreender melhor o mecanismo e especificidade de bioconversão tecidual.

7. REFERÊNCIAS:

- 1 - Arterburn, L. M.; Hall, Eileen B.; Oken, H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 83: 6, Pag. 1467S–1476S, June 2006.
- 2 - Baker, E. J *et al.* Metabolism and functional effects of plant-derived omega-3 fatty acids in humans. *Progress in Lipid Research* 64. Pag. 30–56, August, 2016.
- 3 - Barrett, E. C., M. I. McBurney, and E. D. Ciappio. 2014. Omega-3 fatty acid supplementation as a potential therapeutic aid for the recovery from mild traumatic brain injury/concussion. *Advances in Nutrition* 5 (3):268–77
- 4 - Burdge, G. C.; Wootton, S. A. Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *British Journal Nutrition*. Vol. 88: 4 , Pag. 11-420 October 2002.
- 5 - Burdge, G. α -Linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. Vol. 7, n. 2. Pag. 137-144. March, 2004.
- 6 - Castellini, C *et al.* Expression of genes and localization of enzymes involved in polyunsaturated fatty acid synthesis in rabbit testis and epididymis. *Scientific Reports* 12, 2637. February, 2022.
- 7 - Emken E. A., Adlof, R.O., Gulley, R.M. Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1213 (1994). Pag. 277-288.
- 8 - Folch J, Lees M, Stanley S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226: 497-509

- 9 - Goyens, P. L.L. et al. Compartmental modeling to quantify α -linolenic acid conversion after longer term intake of multiple tracer boluses. *Journal of Lipid Research*. Vol. 46: 7, Pag. 1474-1483 July 2005.
- 10 - Hang, S et al. Compensatory induction of Fads1 gene expression in heterozygous Fads2-null mice and by diet with a high n-6/n-3 PUFA ratio. *Journal of Lipid Research*. Vol. 57. 2016.
- 11 - Hartman L, Lago BCA. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract.* 1973; 22: 475-7.
- 12 - Igarashi, M et al. Dietary n-3 PUFA deprivation for 15 weeks upregulates elongase and desaturase expression in rat liver but not brain. *Journal of Lipid Research*. Vol. 48, Issue 11. Pag. 2463 - 2470. November, 2007.
- 13 - Jacometo, C.B et al. Linoleic and α -linolenic fatty acid consumption over three generations exert cumulative regulation of hepatic expression of genes related to lipid metabolism. *Genes Nutrition* 9, 405 (2014).
- 14 - Matsuzaka, T et al. Dual regulation of mouse Δ 5- and Δ 6-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPAR α . *Journal of Lipid Research* Vol. 43. January, 2002.
- 15 - McConnell, E.L et al. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Vol. 60, Issue 1. Pag. 63-70. January, 2008
- 16 - Seoane, J. L et al. N-3 PUFA as an ergogenic supplement modulating muscle hypertrophy and strength: a systematic review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, June, 2021.
- 17 - Simopoulos, A. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*. Vol. 8.3 Pag 128 2 Mar. 2016
- 18 - Shahidi, F., Ambigaipalan, P. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annu Rev Food Sci Technol*. Vol. 9, Pag. 345-381 2018
- 19 - Shirai, N., Suzuki, H., Wada, S. Direct methylation from mouse plasma and from liver and brain homogenates. *Analytical Biochemistry*. Vol. 343. Pag. 48-53. August, 2005.
- 20 - Smith, G.I. , S et al. Fish oil-derived n-3 PUFA therapy increases muscle mass and function in healthy older adults. *The American Journal of Clinical Nutrition* 102 (1). Pag. 115 – 22. 2015.
- 21 - Patterson, E. et al. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids . *Journal of Nutrition and Metabolism*. Volume 1. Pag. 16. 20122

22 - Perini, J. A. L et al. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. *Revista de Nutrição*. Vol. 23, n. 6. 2010

23 - Tarpila, S *et al.* The effect of flaxseed supplementation in processed foods on serum fatty acids and enterolactone. *European Journal of Clinical Nutrition* 56, 157–165 (2002).

24 - Wathes, D. C. et al. Polyunsaturated Fatty Acids in Male and Female Reproduction, *Biology of Reproduction*, Vol. 77, Issue 2. Pag. 190–201. August, 2007.



Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp



CEUA/Unicamp

INFORMAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP – CEUA/UNICAMP – esclarece que não há necessidade de submeter o projeto de pesquisa **“Avaliação tecido-específica da bioconversão do ácido alfa-linolênico em EPA e DHA em camundongos”**, de responsabilidade do Prof. Dr. Dennys Esper Cintra e da executora Jaqueline Leite da Costa, para análise desta comissão.

Justifica-se por se tratar de projeto que utilizou amostras: Sangue, fígado, testículos e músculos coletados e armazenados anteriormente do protocolo CEUA/Unicamp nº 5224-1/2019 e doados para este projeto. Não houve e não haverá manipulação *in vivo* dentro dos laboratórios credenciados pela CEUA/UNICAMP.

Campinas, 28 de junho de 2022.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente da CEUA/UNICAMP

Rosangela dos Santos
Secretária Executiva CEUA/UNICAMP

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, PRESIDENTE CEUA/UNICAMP**, em 02/07/2022, às 11:34 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 30/06/2022, às 08:20 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
577DCDDC 64FB4E63 997A6DC9 6B9B6758





INFORMAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP – CEUA/UNICAMP – esclarece que não há necessidade de submeter o projeto de pesquisa **“Avaliação tecido-específica da bioconversão do ácido alfa-linolênico em EPA e DHA em camundongos”**, de responsabilidade do Prof. Dr. Dennys Esper Cintra e da executora Myliane Tsukimi Yokoyama Yasunaka, para análise desta comissão.

Justifica-se por se tratar de projeto que utilizou amostras: Sangue, fígado, testículos e músculos coletados e armazenados anteriormente do protocolo CEUA/Unicamp nº 5224-1/2019 e doados para este projeto. Não houve e não haverá manipulação *in vivo* dentro dos laboratórios credenciados pela CEUA/UNICAMP.

Campinas, 28 de junho de 2022.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente da CEUA/UNICAMP

Rosangela dos Santos
Secretária Executiva CEUA/UNICAMP

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, PRESIDENTE CEUA/UNICAMP**, em 02/07/2022, às 11:34 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 30/06/2022, às 08:20 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
8121F091 0D404217 95425294 D93C706A

