

Carolina Da Silva Fernandes

Nutrigenómica: da nutrição moderna a Lamark

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2014

Carolina Da Silva Fernandes

Nutrigenómica: da nutrição moderna a Lamark

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2014

© 2014
Carolina Da Silva Fernandes
TODOS OS DIREITOS RESERVADOS

Carolina Da silva Fernandes

Nutrigenómica: da nutrição moderna a Lamark

Carolina Da Silva Fernandes

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob a orientação do Prof. Doutor José Manuel Cabeda

Resumo

A nutrigenômica estuda o conjunto de alterações que os nutrientes podem causar sobre o genoma humano. Estas alterações podem desencadear diversas alterações no fenótipo expresso, como por exemplo um aumento da propensão para doenças crônicas como a diabetes ou a obesidade. Os estudos nutrigenômicos avaliam também as várias alterações que ocorrem no genoma e epigenoma e como a nutrição pode moldar estas alterações.

O ácido fólico tem um importante papel no processo de metilação que ocorre nos vários estágios de crescimento, principalmente durante o desenvolvimento embrionário, prevenindo o desenvolvimento de malformações e o desenvolvimento de várias doenças em idade adulta.

As ciências *omics* contribuem com um conjunto de tecnologias, que permitem desvendar a forma que os nutrientes afetam o genoma ou o epigenoma e como estas alterações afetam cada indivíduo.

O conjunto de todas estas ciências permitiram no futuro criar dietas personalizadas que permitiram aumentar a qualidade de vida e a diminuir a propensão para desenvolver diversas doenças crônicas.

Palavras-chave: Nutrigenômica, Epigenética, mecanismos epigenéticos, ciências “*omics*”, ácido fólico.

Abstract

Nutrigenomics studies the set of changes that nutrients can cause on the human genome. These changes can trigger a number of changes in the expressed phenotype, such as an increased propensity for chronic diseases such as diabetes or obesity. Nutrigenomics studies also evaluate the various changes that occur in the genome and epigenome and how nutrition can shape them.

Folic acid plays an important role in the methylation process that occurs in various stages of growth mainly during embryonic development by preventing development defects, and the development of various diseases in adulthood.

The omics sciences contribute to a set of technologies, which reveal how nutrients affect the genome and the epigenome and how these changes affect each individual.

The set of all these sciences will in the future enable the creation of customized diets that promote an increased quality of life and reduce the propensity for developing various chronic diseases.

Keywords: Nutrigenomics, epigenetics, epigenetic mechanisms, omics sciences, folic acid

Dedicatória

Àos meus pais.

Manuel António e D. Rosinda.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor José Manuel Cabeda pela orientação, ajuda, dedicação, esclarecimento, simpatia e disponibilidade ao longo da execução deste trabalho. Todo o seu incentivo e conhecimento científico foram decisivos para a conclusão e qualidade do mesmo.

Aos meus pais por todo o carinho e apoio incondicional, não só durante a execução deste trabalho, mas também ao longo de todo o meu percurso académico. O meu muito obrigada por serem sempre o meu apoio e por nos momentos mais difíceis estarem sempre ao meu lado sem nunca duvidarem ou porem em causa as minhas capacidades.

À minha prima Sónia que nos momentos mais difíceis me incentivou e ajudou durante este trabalho. Aos meus amigos e restante família por terem sempre uma palavra de apoio e incentivo nos momentos mais difíceis.

Agradeço por último à Universidade Fernando Pessoa e ao corpo docente pela qualidade de ensino prestado ao longo de todo o meu percurso académico.

Índice

<i>Resumo</i>	<i>VI</i>
<i>Abstract</i>	<i>VII</i>
<i>Dedicatória</i>	<i>VIII</i>
<i>Agradecimentos</i>	<i>IX</i>
<i>Índice de Figuras</i>	<i>VIII</i>
<i>Índice de Tabelas</i>	<i>IX</i>
<i>Lista de Abreviaturas</i>	<i>X</i>
1. Introdução - Nutrigenómica	1
2. Nutrientes e Dieta (interações gene-dieta)	4
2.1. Ácido fólico e o metabolismo celular	8
3. Variações genéticas em humanos	13
3.1. Polimorfismos de nucleótido único – SNPs	13
3.2. Mecanismos epigenéticos	16
3.3. Variação do número de cópias (CNV)	31
4. Ciências “omics” e a nutrigenómica	33
4.1. Transcriptómica	34
4.2. Proteómica	36
4.3. Metabolómica	38
4.4. Epigenómica	39
4.5. Folato e epigenoma	40
5. Desafios e perspectivas da nutrigenómica	45
6. Conclusão	50
7. Bibliografia	51

Índice de Figuras

Figura 1 - Tecnologias omicas na interpretação dos efeitos dos nutrientes sobre o genoma humano.....	2
Figura 2 - Pirâmide alimentar baseada na dieta tradicional mediterrânea	5
Figura 3 - Equação que correlaciona o estado de saúde, genoma e o meio ambiente que nos rodeia ao longo da vida.....	7
Figura 4 - Metabolismo do ácido fólico e a correlação com o metabolismo de transferência de unidade de carbono	11
Figura 5 –Nucleossoma e organização das histonas do “core” e histonas “linkers”. ...	17
Figura 6 – Metilação de uma base citosina..	23
Figura 7 – Reprogramação da metilação de DNA durante o desenvolvimento embrionário de ratos..	25
Figura 8 - Formação e mecanismos de ação dos siRNAs.....	28
Figura 9 - Moléculas utilizadas como ligantes em nanopartículas siRNA de forma a facilitar o seu transporte sistémico	30
Figura 10 - Variações genéticas e a suscetibilidade para o desenvolvimento de doença..	32
Figura 11 – As diferentes etapas envolvidas na expressão genética e as tecnologias utilizadas para analisar cada etapa e os efeitos na saúde humana.....	34
Figura 12 - Figura ilustrativa das possíveis alterações na expressão do gene agouti e os vários fenótipos expressos.....	43
Figura 13 - Novas abordagens da indústria que podem surgir com os novos desenvolvimentos nutrigenómico	48

Índice de Tabelas

Tabela 1- Classes de modificações químicas de histonas com efeito na regulação epigenética..	18
Tabela 2 – Exemplos de componentes bioativos dos alimentos que podem modificar o risco de vários cancros.	46

Lista de Abreviaturas

THF - tetrahidrofolato

ac – acetilação

AMY1 – gene da amílase salivar

A^{vy} – Gene agouti amarelo viável (do inglês *agouti viable yellow*)

C – citosina

CNV - variação do número de cópias (do inglês *copy number variation*)

DHF – dihidrofolato

DNA – ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

DNMT – Desoxinucleotidil metiltransferases

dsRNAs – RNAs de cadeia dupla

dTMP – timidilato

dUMP – desoxiuridilato

FRS - recetores de folato

GCPII - glutamato carboxipeptidase

HCY – homocisteína

IAP - partícula intracistrenal A (do inglês *intracisternal A particle*)

K – lisina

me – metilação

mRNA –RNA mensageiro

MTHFR - metilenotetrahidrofolato redutase

ncRNAs - RNAs não codificantes

PCFT1 – transportador transmembranar de folato acoplado a bomba de prótons (do

Inglês *proton-coupled folate transporter*)

PGCs - células germinativas primordiais

ph – fosforilação

R – arginina

RFC – pelo transportador de folato reduzido (do inglês *reduced folate carrier*)

RISC - complexo silenciador induzido por RNA (do inglês *RNA-induced silencing complex*)

RITS - complexo de silenciamento transcricional induzido por RNA (do inglês *RNA-induced transcriptional silencing complex*)

RNA – ácido ribonucleico (do inglês “*ribonucleic acid*”)

S – serina

SAH – S-adenosilhomocisteína

SAHH – S-adenosilhomocisteína hidrolase

SAM - S-adenosilmetionina

siRNAs - pequenos RNA de interferência (do inglês *small interfering RNA*)

SNPs – polimorfismos de nucleótido únicos (do inglês *single nucleotide polymorphisms*)

T – Timina

THF – tetraidrofolato

THF – tetraidrofolato

Ub – ubiquitinação

1. Introdução - Nutrigenómica

A Nutrigenómica, estudando a interação entre genes, produtos genéticos e hábitos alimentares procura compreender quais os seus efeitos na saúde de cada indivíduo e criar estratégias de intervenção para diminuir a incidência de diversas doenças, diminuir a morbidade e mortalidade associada às mesmas e aumentar a qualidade de vida (Trujillo *et al.*, 2006).

Para a nutrigenómica os estudos epidemiológicos são uma importante fonte de informação, já que contribuem para uma perceção mais alargada da importância da oferta nutricional durante determinados períodos e dos seus efeitos na saúde a longo e médio prazo. Existem diversos exemplos históricos como o “inverno da fome holandesa” (Ruemmele e Garnier-Lengliné, 2012). Este desastre humanitário ocorreu durante a ocupação nazi no inverno de 1944, tendo a população sofrido com uma enorme escassez de alimentos (as rações diárias chegaram a variar entre 400 e 800 calorias). Uma vez que estavam disponíveis informações detalhadas das rações fornecidas semanalmente e os registos de nascimentos, tornou-se possível correlacionar todos os dados (Kussmann *et al.*, 2010). Os resultados destes estudos de correlação revelaram que a exposição à fome no período pré-natal teve efeitos negativos a longo prazo. Com efeito, os indivíduos expostos a condições nutricionais adversas *in utero* sofreram posteriormente uma maior incidência de doenças crónicas, nomeadamente um risco de doenças cardiovasculares duas vezes maior que o grupo controlo, bem como um aumento do risco de distúrbios metabólicos como a obesidade, diabetes e cancro (Ruemmele e Garnier-Lengliné, 2012). Assim, estes estudos epidémicos revelaram claramente que a nutrição materna antes e durante a gravidez tem influência na saúde das gerações seguintes (Roseboom *et al.*, 2011; Parlee e MacDougald, 2014).

Para além dos estudos epidemiológicos, a nutrigenómica tem beneficiado imenso com os grandes avanços tecnológicos tanto da genómica como da nutrição (Constantin e Wahli, 2013), procurando com as mais avançadas ferramentas disponíveis, decifrar o impacto que fatores nutricionais têm sobre a regulação e expressão de genes específicos, associando o potencial destes compostos no controlo de doenças e os seus efeitos positivos a curto e longo prazo (Cahill *et al.*, 2011). Desta forma, utilizando um grande leque de áreas científicas como a nutrição, a genómica, a bioinformática, a biologia molecular, a epidemiologia e a medicina molecular, a nutrigenómica procura compreender o efeito dos nutrientes sobre o genoma, o epigenoma, o transcriptoma, o proteoma e o metaboloma (Neeha e Kinth, 2013; Cahill *et al.*, 2011). Assim, a nutrigenómica depende de um novo conjunto de tecnologias denominadas por “*omics*” que procuram definir e caracterizar as “assinaturas dietéticas” que refletem a ação dos nutrientes na estrutura e expressão do genoma e posteriormente os seus efeitos sobre a saúde, como é ilustrado na figura 1.

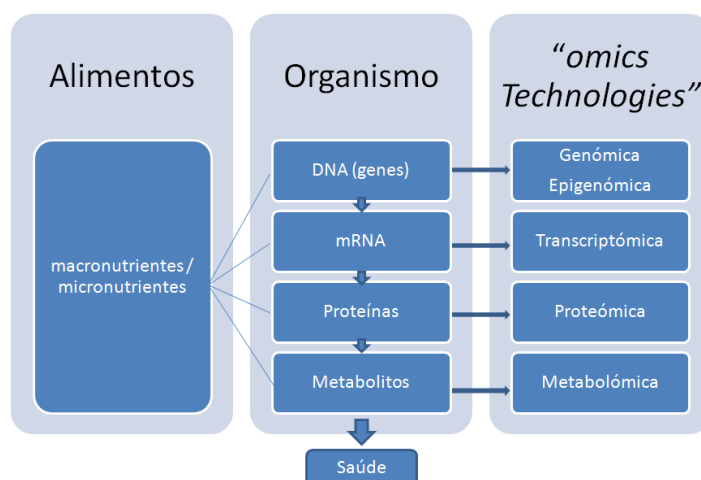


Figura 1 - A nutrigenómica estuda a forma como os nutrientes interferem a vários níveis a expressão do genoma utilizando as “*omics Technologies*” como ferramentas indispensáveis (figura baseada em Constantin e Wahli, 2013).

Desta forma, utilizando as mais diversas e avançadas ferramentas moleculares é possível identificar e entender as várias respostas induzidas por uma dieta aplicada em indivíduos ou grupos populacionais (Sales *et al.*, 2014). Com base neste conhecimento, e uma vez que, nem todos os indivíduos apresentam uma resposta similar à dieta, a nutrição e a genômica contribuem para a criação de dietas personalizadas, com o objetivo de prevenir ou retardar o aparecimento de doenças ou otimizar e manter a saúde humana (Trujillo *et al.*, 2006).

Ao longo do trabalho irei apresentar de que forma os nutrientes e componentes bioativos podem afetar a expressão do genoma a vários níveis, tendo em conta a interindividualidade proporcionada pela variabilidade genética. Abordando a importância das “*omics Technologies*”, na identificação e caracterização dos efeitos que os nutrientes têm sobre a expressão de genes a vários níveis moleculares.

2. Nutrientes e Dieta (interações gene-dieta)

Ao longo dos séculos a dieta foi associada a uma fonte de energia que garantia a sobrevivência dos indivíduos (Neeha e Kinth, 2013). Empiricamente também lhe foi atribuída uma conotação que a associava à capacidade de prevenir ou mesmo curar determinadas doenças, promovendo a saúde e bem-estar (Ruemmele e Garnier-Lengliné, 2012). Em diversos espólios arqueológicos podemos constatar que civilizações antigas como a Egípcia, Persa e algumas orientais, os alimentos assumem a conotação de remédio, com capacidades para tratar e prevenir a doença (Astarita e Langridge, 2013). Dizia Hipócrates: “*deixa o alimento ser o teu remédio e o remédio ser teu alimento*”. Com esta expressão o pai da medicina ocidental revelava a percepção, apesar de pouco clara, de que os componentes presentes nos alimentos podem ser utilizados em benefício humano.

A dieta oferece ao organismo substâncias com diversas funções: fornecer energia (hidratos de carbono e lípidos), fontes para estruturas celulares (proteínas) e controlo metabólico (vitaminas e nutrientes), de forma a manter a homeostasia do organismo (Sales *et al.*, 2014). Assim, e de modo geral, os componentes presentes nos alimentos podem ser caracterizados como macronutrientes ou micronutrientes. Os macronutrientes são responsáveis por fornecer energia e material estrutural ao organismo (proteínas, hidratos de carbono e lípidos) e os micronutrientes (vitaminas, minerais, fitonutrientes, aminoácidos essenciais e ácidos gordos) com um papel importante em vários processos reguladores (Constantin e Wahli, 2013). Os nutrientes ingeridos na dieta diária influenciam significativamente os processos celulares associados à saúde e à doença, como o metabolismo carcinogénico, equilíbrio hormonal, sinalização celular, controlo

do ciclo celular, apoptose, angiogênese e alterações dos níveis de energia necessários (Trujillo *et al.*, 2006; Ferguson, 2006).

A dieta mediterrânea foi a base dietética tradicional da alimentação em Portugal, caracterizada pelo consumo elevado de alimentos de origem vegetal (cereais, frutos, verduras, legumes), peixe, consumo moderado de ovos, carnes brancas, produtos lácteos (leite, iogurtes), consumo reduzido de carnes vermelhas e ingestão moderada de álcool, principalmente vinho, durante as refeições, tendo como principal fonte de gordura adicional o azeite. A pirâmide alimentar da figura 2 descreve graficamente as porções

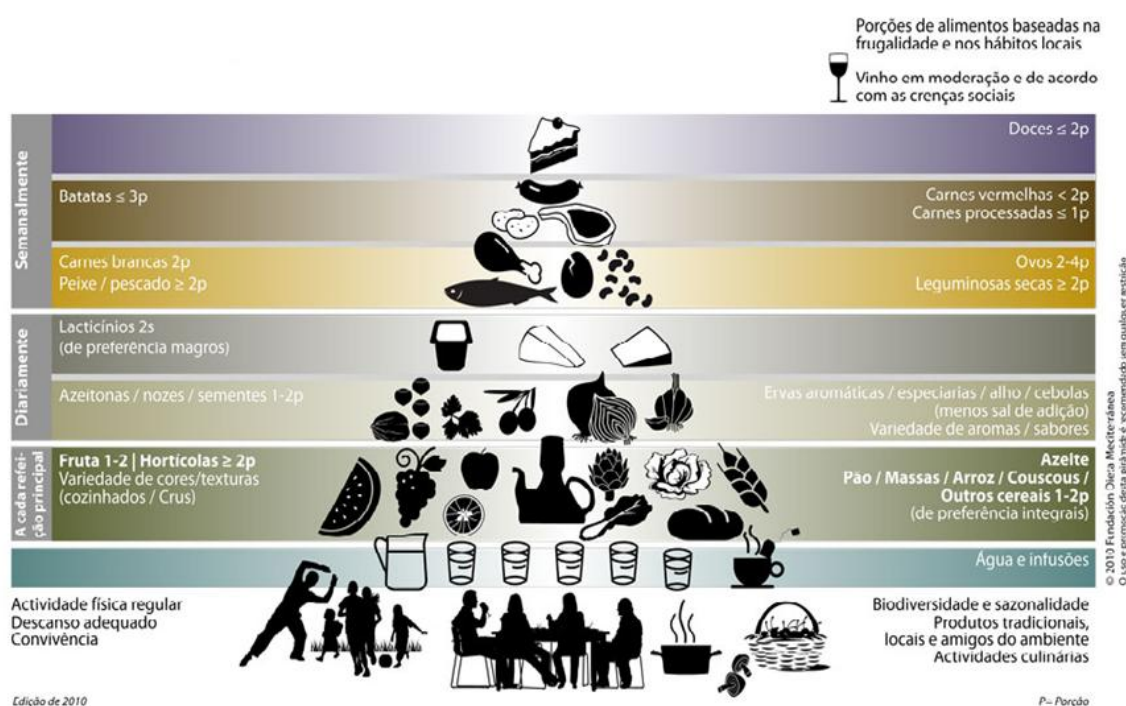


Figura 2 - Pirâmide alimentar baseada na dieta mediterrânea, tendo em conta que as doses se adequam a um indivíduo adulto. Baseado (Bach-Faig *et al.*, 2011)

alimentares da dieta mediterrânica e a frequência da sua utilização diária e semanal tendo em conta os hábitos locais e a disponibilidade sazonal dos alimentos (Figura 2). Esta representação gráfica foi desenvolvida com o intuito de fornecer uma ferramenta de apoio à população em geral, para que adote um estilo de vida saudável e sustentável.

Diversos estudos efetuados ao longo dos anos demonstram os benefícios desta dieta, diminuindo o risco de desenvolver vários distúrbios metabólicos como a diabetes tipo II e doenças cardiovasculares, contribuindo também para a diminuição da incidência de algumas doenças neurodegenerativas e de cancro (Bach-Faig *et al.*, 2011).

No entanto, o estado nutricional de cada indivíduo não depende apenas dos alimentos ingeridos sendo a herança genética e o estado físico, emocional e social, fatores importantes para garantir a saúde de cada indivíduo (Sales *et al.*, 2014). O que ingerimos não afeta apenas a nossa saúde mas também a dos nossos descendentes, já que como vimos acima exposição *in útero* a fatores dietéticos pode, não só influenciar o desenvolvimento embrionário, mas também a saúde a longo prazo (Trujillo *et al.*, 2006).

Os vários avanços que surgiram na área nutricional modificaram a forma como olhamos para os alimentos havendo uma necessidade crescente de avaliar e compreender o nosso estado de saúde e correlacioná-lo como as necessidades nutricionais individuais. Esta nova percepção permitiu criar uma nova abordagem na indústria nutricional, procurando criar novos produtos para satisfazer as necessidades de grupos específicos de consumidores saudáveis, em situação de risco ou doentes (Kussmann *et al.*, 2010). No mercado japonês já se encontram disponíveis diversos alimentos, aprovados pelo ministério japonês da saúde após vários estudos clínicos, que apresentam indicações específicas para determinadas doenças, como a hipertensão, colesterol ou diabetes (Neeha e Kinth, 2013).

Apesar de ser amplamente aceite que o estado de saúde é resultado da interação entre o meio ambiente que nos rodeia, no qual a dieta assume uma papel determinante, e o nosso genoma. Perceber como estes três componentes (saúde, meio ambiente e genoma)

(Figura 3) se correlacionam ainda é um grande desafio para a comunidade científica, sendo necessário avaliar cada um dos componentes em separado com o apoio de novas estratégias de pesquisa que surgem com os novos avanços tecnológicos (Williams *et al.*, 2008).

$$\text{Estado de saúde (doença vs saudável)} = \int_{\text{concepção}}^{\text{atualidade}} \text{exposição} \times \text{genoma}$$

Figura 3 - Equação que correlaciona a relação entre o estado de saúde e a interação entre o meio que nos rodeia desde a concepção até a atualidade e informação genética. Imagem baseada (Williams *et al.*, 2008)

Estes novos avanços tecnológicos permitiram uma análise mais profunda aos alimentos, não se limitando a estimar o seu valor nutricional, com base no teor em hidratos de carbono, gorduras, proteínas, água, vitaminas e minerais (Astarita e Langridge, 2013).

Vários estudos realizados ao longo dos anos têm demonstrado, que os nutrientes e os compostos bioativos presentes em alimentos podem regular ou influenciar determinados genes, causando alterações na expressão genética com benefícios para a saúde (Sales *et al.*, 2014)

Os fitoestrogénios, tais como, a genisteína e a daidzeína, são dos exemplos mais bem documentados que demonstram a interação entre componentes alimentares e os produtos genéticos. Estes têm capacidade de modular a expressão genética, interagindo diretamente com os recetores de estrogénios, tendo um efeito similar aos estrogénios endógenos (Ferguson, 2006).

Outro exemplo é o resveratrol presente nas sementes, casca de uva e vinho tinto, que possuem a capacidade de se ligarem aos recetores de estrogénio α e β , ativando a

transcrição dos genes associados diminuindo o risco de doenças cardiovasculares. Este fitoestrogênio associa-se ao conhecido “paradoxo francês”, em que o consumo moderado de vinho tinto leva a uma diminuição da incidência de doenças cardiovasculares. Também estudos *in vivo* em fêmeas adultas de rato demonstram, que a suplementação com resveratrol tem efeito sobre o peso corporal, ciclo reprodutor e induz a hipertrofia dos ovários (Ferguson, 2006).

As crescentes mudanças nos hábitos alimentares e estilos de vida da população mundial levam a um aumento da incidência dos distúrbios relacionados com a dieta, tornando-se um problema de saúde pública que a comunidade científica procura solucionar (Neeha e Kinth, 2013; Williams *et al.*, 2008).

Tendo em conta que, os componentes presentes nos alimentos interagem com o nosso organismo a vários níveis celulares, estes podem desencadear processos celulares que levam à expressão de diferentes fenótipos. Logo a investigação nutricional em áreas correlacionadas, como a nutrigenómica, concentra-se em promover a saúde, prevenir ou retardar o aparecimento da doença e otimizar o desempenho fisiológico.

2.1.Ácido fólico e o metabolismo celular

O ácido fólico ou folato (forma comum nos alimentos) são sinónimos para o ácido pteroilglutâmico, sendo duas formas de vitamina B hidrossolúveis (vitamina B9) (Taulikar e Arulkumaran, 2013). Estão presentes nos alimentos principalmente sob a forma de poliglutamatos na forma inativa (Nazki *et al.*, 2013). O organismo humano não possui capacidade para sintetizar ácido fólico, sendo obtido através dos mais

diversos alimentos (vegetais de folhas verdes, batatas, fígado, entre outros) ou através de suplementos alimentares. (Gonda *et al.*, 2012).

Os folatos são essenciais para a saúde, fertilidade e desenvolvimento humano. A deficiência deste nutriente tem sido associada a diversas doenças como a anemia mieloblástica, aumento do risco de doença cardiovascular, cancro, atraso no crescimento e diversas complicações na gravidez (Thakur *et al.*, 2013). Por outro lado, a suplementação com ácido fólico oferece uma série de benefícios para a saúde, prevenindo defeitos do tubo neural, fissura oro-facial, defeitos cardíacos congénitos, complicações na gravidez, prevenção de vários tipos de cancro e problemas psiquiátricos (Nazki *et al.*, 2013).

O ácido fólico é importante na síntese de DNA, crescimento e divisão celular, atuando também como substrato ou cofator em inúmeras reações biológicas. Tendo particular importância durante a gravidez uma vez que o tecido placentário e feto apresentam um índice elevado de multiplicação celular, sendo indispensável a suplementação no primeiro trimestre de gravidez (Cao *et al.*, 2014).

O ácido fólico é constituído por, um anel aromático de pteridina ligado através de um grupo metileno de ácido p-aminobenzóico e a um ou mais ácidos glutâmicos. Apresenta duas formas reduzidas denominadas por dihidrofolato (DHF) e tetahidrofolato (THF), com um papel determinante na transferência de unidades monocarbonadas, que se ligam à posição N5 ou N10, ou ambas, do anel de pteridina. Dando origem ao 5-metiltetrahidrofolato (quando o grupo de carbono se liga à posição N5) ou 5,10-metilenotetrahidrofolato (formado quando o grupo de carbono cria pontes entre os nitrogénios nas posições 5 e 10). As unidades de carbono podem estar na forma de

metilo (-CH₃), metileno (-CH₂-), metenilo (=CH-), formilho (-CHO-) ou formimino (-CH=NH) (Guéant *et al.*, 2013).

Os poliglutamatos são hidrolisados, após a sua ingestão, por ação da glutamato carboxipeptidase (GCP II), presente na membrana das células em bordadura de escova da zona apical do intestino, convertendo-se em monoglutamatos. Estes são absorvidos através do transportador transmembranar de folato (PCFT1 –*proton-coupled folate transporter*) localizado na zona ácida do epitélio intestinal superior e pelo transportador de folato reduzido (RFC – *reduced folate carrier*), que consiste numa proteína transmembranar de folatos presente na zona de pH neutro do intestino distal (Guéant *et al.*, 2013).

Após a absorção, os monoglutamatos são direcionados para o fígado ou tecidos periféricos onde podem ser captados por três sistemas proteicos diferentes: transportador de folato reduzido (RFC), recetores de folato (FRS) e transportador de folato acoplado a bomba de protões (PCFT1) (Guéant *et al.*, 2013).

O folato é posteriormente metabolizado a 5-metiltetrahidrofolato no intestino e ou no fígado. Este monoglutamato consiste na principal forma de ácido fólico na corrente sanguínea associado a proteínas transportadoras que o dirigem para tecidos não hepáticos, onde são retidos no interior das células após a conversão a poliglutamatos (Nazki *et al.*, 2013).

Nas células o 5-metiltetrahidrofolato é convertido a tetrahidrofolato (THF) por ação da metionina síntetase, enzima dependente da vitamina B12 e que interfere no ciclo da metionina, reconvertendo a homocisteína em metionina (Crider *et al.*, 2012).

Como alternativa, no ciclo de ácido fólico (Figura 4) o ácido fólico pode ser a reduzido a dihidrofolato (DHF) e de seguida a tetrahidrofolato por ação da dihidrofolato redutase.

O tetrahydrofolato é convertido em 5,10-metilenotetrahydrofolato por ação da serina hidroximetilase, enzima dependente da presença de vitamina B6 (figura 4). Posteriormente é reduzido pela enzima metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR), a 5-metilenotetrahydrofolato (figura 4).

A enzima MTHFR desempenha um papel fundamental para manter o fluxo de unidades metilo, permitindo a remetilação da homocisteína em metionina, (reação dependente da vitamina B12 e da enzima metionina sintetase) e a síntese de timina (precursor da timidina, nucleótido presente no DNA) (Ho *et al.*, 2013).

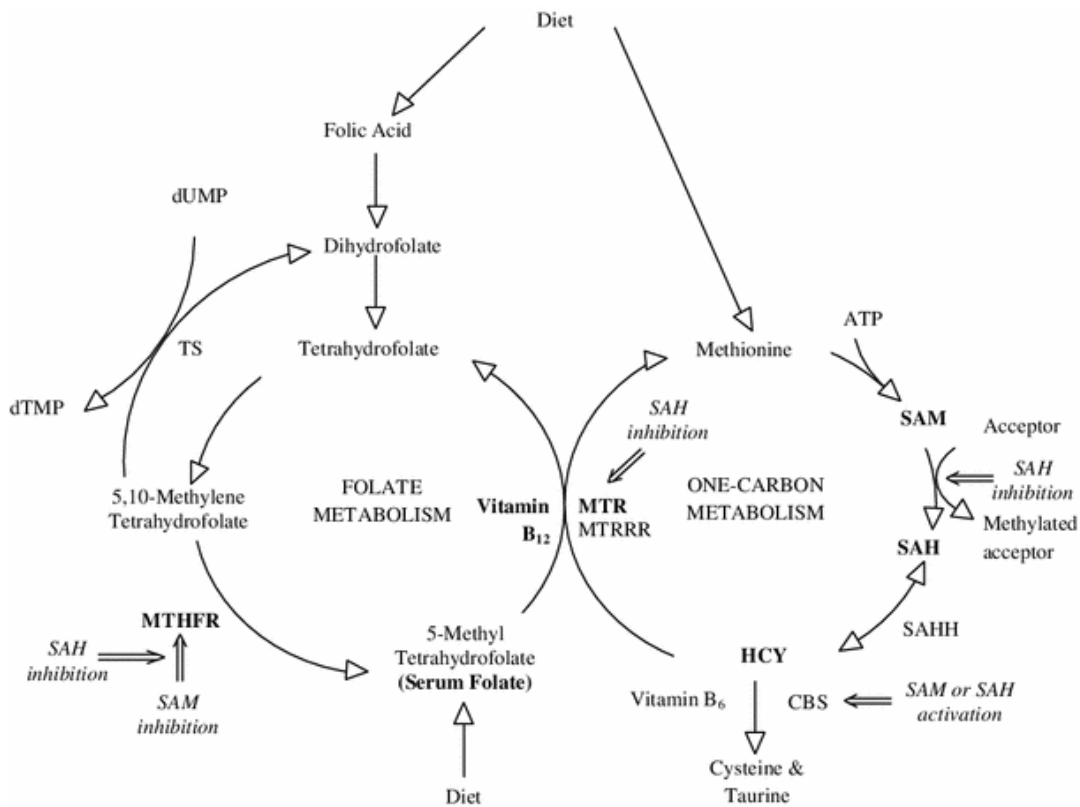


Figura 4 - Metabolismo do ácido fólico e a correlação com o metabolismo de transferência de unidade de carbono (Ho *et al.*, 2013).

A metionina é o substrato para a S-adenosilmetionina (SAM), que funciona como cofator e dador de grupos metilo em numerosas reações de metilação, tanto do DNA como do RNA, metilação de neurotransmissores e de outras moléculas como os fosfolípidos ou proteínas (por exemplo as histonas) (Crider *et al.*, 2012).

O folato e a homocisteína são moléculas chave para os vários mecanismos de metilação (ver 4.5), uma vez que a reação que converte a homocisteína em metionina utiliza o folato como cofator e posteriormente dá origem a SAM. Níveis baixos de folato levam à acumulação de homocisteína no sangue, originando hiperhomocisteinemia, fator de risco para vários distúrbios relacionados com a gravidez (distúrbios do tubo neuronal, deslocamento da placenta, pré-eclampsia e conseqüentemente pode levar a abortos). Sendo um processo reversível com suplementação com ácido fólico e Vitamina B12 (Cao *et al.*, 2014).

As unidades de carbono presentes no citoplasma, mediadas pelo metabolismo dos folatos, interferem em três vias biossintéticas: biossíntese de purinas – 10-formiltetrahydrofolato; biossíntese de timidilato – onde o metileno-tetrahydrofolato permite a metilação do desoxiuridilato (dUMP) a timidilato (dTMP) (figura 4); e a remetilação da homocisteína em metionina (figura 4), que requer como referido anteriormente, o 5-metiltetrahydrofolato (Stover, 2009).

Logo, o metabolismo do folato desempenha um papel importante na síntese de ácidos nucleicos, na regeneração da metionina e desempenha um papel fundamental na síntese de S-adenosilmetionina (SAM)

3. Variações genéticas em humanos

A variabilidade entre indivíduos em resposta às várias intervenções dietéticas é um fenómeno evidente em pesquisas nutricionais (Cahill *et al.*, 2011). Alterações na dieta promovem diferentes fenótipos que podem diferir significativamente entre indivíduos, tais como os níveis de colesterol, peso corporal e pressão sanguínea. O fenótipo expresso e o estado nutricional de cada indivíduo estão dependentes de vários fatores como a idade, sexo, atividade física, hábitos tabágicos e fatores genéticos (Cahill *et al.*, 2011).

Torna-se cada vez mais evidente que os modelos nutricionais atuais apenas são adequados para uma pequena percentagem da população, levando os cientistas a procurarem adaptar a dieta consoante as características genéticas de cada indivíduo (Cahill *et al.*, 2011).

Neste capítulo abordo a importância das variações genéticas que podem ocorrer no genoma humano que incluem os Polimorfismos de nucleótido único, variações epigenéticas e da variação do número de cópias.

3.1. Polimorfismos de nucleótido único – SNPs

A maioria (90%) das variações genéticas no genoma Humano tem origem em polimorfismos de nucleótido único (SNPs – *single nucleotide polymorphisms* (Ferguson, 2006). Logo é indispensável reconhecer a importância de SNP em genes que regulam a função dos nutrientes (Ferguson *et al.*, 2007).

A variabilidade genética, associada a polimorfismos, juntamente com a interação gene-nutriente promovem alterações na suscetibilidade à doença e diferentes respostas a medicamentos, substâncias tóxicas, atividade física e dieta (Williams *et al.*, 2008).

Todos os processos biológicos como a ingestão, absorção, digestão, transporte e excreção de nutrientes e componentes alimentares bioativos estão dependentes de proteínas como as enzimas, recetores, transportadores e hormonas que podem sofrer alterações e dar origem a diversos distúrbios metabólicos. As mutações em genes que codificam o metabolismo dos nutrientes, são denominados por erros inatos do metabolismo e podem afetar significativamente a resposta metabólica aos alimentos, as necessidades nutricionais, a segurança alimentar e a eficácia dos fatores alimentares, no controlo de determinadas doenças (Cahill *et al.*, 2011; Neeha e Kinth, 2013). Um significativo número de estudos, em várias áreas, tem demonstrado que umas das razões que originam diferentes respostas a dietas padronizadas são os SNPs (Neeha e Kinth, 2013). Com o desenvolvimento de novas tecnologias e ferramentas (como os ensaios TaqMan®, SNP Genotyping Assay®, Sequenom®, entre outros) é possível caracterizar esta diversidade genómica e associá-la ao desenvolvimento de diversos distúrbios como a obesidade, as doenças cardiovasculares e o cancro (Ferguson, 2006; Neiberger e Johnson, 2011; Ferguson *et al.*, 2007).

Os SNP's ocorrem aproximadamente a cada 100 a 300 pares de bases ao longo de todo o DNA. Dois em cada três SNPs envolvem a substituição de uma citosina (C) por uma timina (T), ocorrendo tanto em regiões codificantes (genes) como em regiões não codificantes do genoma (Ferguson, 2006).

A variação genética induzida por SNPs pode afetar a resposta aos nutrientes, como se verifica na intolerância à lactose (Cahill *et al.*, 2011). A intolerância à lactose é uma

condição resultante da produção inadequada de lactase no intestino delgado, que leva a um desconforto intestinal (dores abdominais e distensão, flatulência e diarreia) e sintomas sistêmicos (dores de cabeça, tonturas, dores articulares e musculares e arritmias cardíacas) que podem surgir logo após a ingestão de produtos que contêm lactose (Vernia *et al.*, 2010).

Estudos recentes demonstram que a idade em que a intolerância se manifesta e o grau de intolerância à lactose está relacionado com SNPs específicos. Tendo sido também provado que os SNPs variam consoante o grupo racial, existindo pelo menos, oito SNPs únicos que originam diferentes fenótipos (Brown-Esters *et al.*, 2012).

Um exemplo claro da influência de SNPs em genes que regulam a função dos nutrientes ocorre no gene que codifica a enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) (Ferguson *et al.*, 2007). Esta enzima atua no ciclo do ácido fólico (ver 2.1) possui uma variante designada por MTHFR C677T, na qual ocorre a substituição do aminoácido alanina pelo aminoácido valina na posição 222. Esta substituição acarreta uma atividade enzimática de apenas 20 a 30% em indivíduos homozigóticos e de 65% em indivíduos heterozigóticos (Ho *et al.*, 2013; Fard-Esfahani *et al.*, 2011). Esta enzima catalisa a conversão de 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-metileno-THF) a 5-metiltetrahidrofolato (5-metil-THF), molécula que fornece um grupo metilo responsável pela metilação da homocisteína em metionina (Fard-Esfahani *et al.*, 2011) (figura 4). Por sua vez a metionina é o substrato para a produção de S-adenosilmetionina (SAM), dador universal de grupos de metilo em processos como a metilação de DNA e proteínas (Monteiro *et al.*, 2014). Deste modo, a diminuição de 5-metil-THF conduz à diminuição da SAM disponível, que conseqüentemente leva à hipometilação do DNA,

dando origem aos mais diversos problemas como alguns processos de carcinogénese (Fard-Esfahani *et al.*, 2011).

Ao serem identificados os SNPs que influenciam diretamente a interindividualidade nutricional, permitirão providenciar novas abordagens que complementam as necessidades individuais, melhorando a saúde e longevidade (Ferguson, 2006). Novas tecnologias permitem identificar haplótipos únicos, responsáveis pelo desenvolvimento de certos distúrbios associados a SNPs e criar marcadores que permitem detetar precocemente doenças relacionadas com a alimentação (Neeha e Kinth, 2013).

A nutrigenómica permitirá construir as bases científicas que contribuem para a compreensão da variabilidade humana nas preferências, necessidades e respostas à dieta de forma a garantir a manutenção da saúde e prevenção da doença (Kusmann *et al.*, 2010).

3.2. Mecanismos epigenéticos

Diversas análises moleculares revelaram que a regulação de genes é epigeneticamente controlada por três mecanismos diferentes: modificação de histonas, metilação do DNA e interferência do RNA.

Estes mecanismos epigenéticos são importantes nos processos de diferenciação celular e tecidual que ocorrem durante o desenvolvimento de todos os organismos, permitindo que estes se adaptem a influências internas e externas que possam surgir, facultando aos organismos desenvolver identidades celulares distintas durante o desenvolvimento, resistir a situações de *stress*, otimizar padrões de expressão genética e permitir a sobrevivência em situações adversas (Ruemmele e Garnier-Lengliné, 2012; Joh *et al.*, 2014).

As alterações epigenéticas contribuem para alterações no fenótipo das gerações seguintes que prevalecem ao longo da vida. Alteram a transcrição de genes e consequentemente, os processos metabólicos, controlo homeostático e processos de diferenciação dos tecidos (Burdge e Lillycrop, 2010).

Todas as alterações epigenéticas são reversíveis, permitindo que a célula responda de forma dinâmica e adaptativa (Joh *et al.*, 2014).

- MODIFICAÇÃO DE HISTONAS

As histonas são subdivididas em histonas do “*core*” e histonas “*linkers*”. As histonas do “*core*” incluem duas cópias das histonas H2A, H2B, H3 e H4 que formam um nucleossoma quando envolvidas em torno da cadeia de DNA e as histonas “*linkers*”, pertencentes à família de histonas H1, que se localizam à entrada e saída da cadeia de DNA de forma a manter o DNA corretamente envolvido em torno das histonas do “*core*” como demonstra a figura 5 (Li *et al.*, 2014).

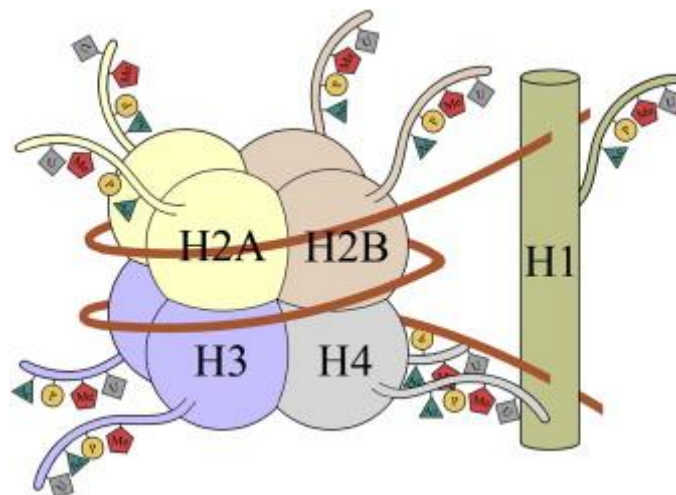


Figura 5 – Esquema do nucleossoma demonstrando a organização das histonas do “*core*” (H2A, H2B, H3 e H4) e histonas “*linkers*” (H1) (Li *et al.*, 2014).

As histonas permitem a organização tridimensional do DNA formando a cromatina que armazena e protege o DNA. Estas permitem ligar ou desligar determinados genes, consoante a sua localização geográfica e controla o acesso dos fatores de transcrição às regiões promotoras correspondentes. Todas as alterações que possam surgir nas histonas podem comprometer as funções dos genes (Ruemmele e Garnier-Lengliné, 2012).

As modificações pós-traducionais que ocorrem nas histonas, geralmente nas porções N-terminais, são um mecanismo epigenético que permite a ativação da transcrição ou o silenciamento de um gene específico. Estas incluem a metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação ou ADP ribosilação, sendo o seu conjunto referido como “código de histonas”, a tabela 1 apresenta algumas destas modificações e as funções reguladoras que podem ser alteradas (Salbaum e Kappen, 2012).

Tabela 1- Classes de modificações químicas de histonas com efeito na regulação epigenética. (Kouzarides, 2007).

Methylation (arginines)	R-me1 R-me2a R-me2s	Transcription
Phosphorylation	S-ph T-ph	Transcription, Repair, Condensation
Ubiquitylation	K-ub	Transcription, Repair
Sumoylation	K-su	Transcription
ADP ribosylation	E-ar	Transcription
Deimination	R > Cit	Transcription
Proline Isomerization	P-cis > P-trans	Transcription

A acetilação de histonas é uma das modificações pós-traducionais mais bem estudada em histonas. Esta alteração química das histonas ocorre nas histonas do “core” (H2A, H2B, H3 e H4) através da adição de um grupo acetilo (CH_3CO^-) carregado negativamente. A acetilação neutraliza a carga positiva das histonas, diminuindo a

afinidade destas para o DNA e permitindo o recrutamento de fatores de transcrição que ativam a transcrição do genoma (Li *et al.*, 2014).

O mecanismo de acetilação origina modificações dinâmicas e reversíveis, sendo regulado pela ação acetiltransferases de histonas que promovem a acetilação ou por desacetilases de histonas que promovem a desacetilação (Li *et al.*, 2014).

Alguns autores defendem que este mecanismo de modificação de histonas não deve ser qualificado como ativador ou supressor da expressão genética, mas como um facilitador da dinâmica dos nucleossomas. Estudos em células T humanas demonstraram que existem tantos genes que sofrem ação das acetiltransferases de histonas como das desacetilases de histonas e que os genes que apresentam silenciamento mediado por mecanismos epigenéticos não apresentam uma maior concentração de desacetilases de histonas. Logo é necessário fazer uma avaliação global dos níveis de acetilação de histonas para avaliar as suas consequências na expressão genética (Henikoff e Shilatifard, 2011). Embora ainda não sejam claros os efeitos destas modificações sobre o genoma é conhecido que os níveis de acetilação de histonas variam tanto em células normais como em células cancerígenas (McBrian *et al.*, 2013).

Um estudo efetuado recentemente demonstrou que os níveis de acetilação podem regular algumas funções biológicas como o pH intracelular das células. Foi demonstrado que o pH intracelular diminui com desacetilação global de histonas por ação das desacetilases de histonas, por outro lado o aumento global dos níveis acetilação de histonas promove a diminuição dos níveis intracelulares do pH. Foi também descrito neste estudo, a possibilidade de usar inibidores de desacetilases de histonas no tratamento de cancros que apresentam um pH intracelular alcalino, estas células tumorais apresentam um fenótipo mais agressivo e uma resposta baixa às

terapias convencionais. Estas novas perspetivas poderão levar à descoberta de novas vias terapêuticas (McBrien *et al.*, 2013).

Outro mecanismo de modificação de histonas igualmente bem estudado é a metilação de histonas. A metilação de histonas ocorre principalmente em resíduos de lisina e arginina. As lisinas podem ser monometiladas, dimetiladas ou trimetiladas e as argininas podem ser monometiladas ou dimetiladas simetricamente e assimetricamente (Greer e Shi, 2012). O processo de metilação é catalisado por enzimas designadas por histonas metiltransferases. Estas transferem um grupo metilo proveniente da S-adenosilometionina (SAM) para aos aminoácidos (lisina ou arginina) localizados na zona N-terminal das histonas (Li *et al.*, 2014; Salbaum e Kappen, 2012).

A metilação de histonas possui uma nomenclatura própria, sendo indicado em primeiro a histona onde ocorre a metilação (por exemplo H3 ou H4), de seguida o aminoácido e a sua posição, sendo representado pela letra K nas lisinas e pela letra R nas argininas, e por fim o nível de metilação (me1, me2 ou me3), tendo a seguinte configuração H3K4me3, por exemplo (Salbaum e Kappen, 2012).

Inicialmente este mecanismo era considerado irreversível. A descoberta de desmetilases (como por exemplo a H3K4 desmetilase e da desmetilase específica de lisina na Histona 1A – LSD1) permitiu comprovar que o processo de metilação de histonas é reversível. Promovendo alterações na conformação da cromatina ou o recrutamento de outras moléculas que a modificam e alterações da transcrição do genoma (Greer e Shi, 2012).

O facto de a H3K4me3 estar habitualmente associada à ativação da transcrição enquanto a H3K27me3 é associada á repressão da cromatina exemplifica como a metilação de histonas em locais diferentes leva à expressão de genes ou a alterações da cromatina. Por outro lado, a alteração dos níveis de metilação no mesmo local pode

conduzir a diferentes resultados como ocorre quando a H3K79me2 regula o ciclo celular, enquanto a H3K79me3 regula a transdução de sinais para o interior da célula (Greer e Shi, 2012).

A dinâmica da metilação de histonas tem um importante papel na regulação de vários processos biológicos, como a regulação do ciclo celular, controlo de danos no DNA, respostas adaptativas ao *stress*, desenvolvimento e diferenciação celular (Greer e Shi, 2012).

A fosforilação de histonas é outro mecanismo de modificação de histonas que ocorre maioritariamente nas zonas N-terminais das histonas, mediado por cinases e fosfatases que adicionam ou removem as modificações. Neste processo a cinase transfere um grupo fosfato proveniente do ATP para o grupo hidroxilo da cadeia lateral dos aminoácidos alvo (serinas, treoninas ou tirosinas), alterando a carga das histonas e consequentemente a organização da cromatina (Bannister e Kouzarides, 2011).

O último mecanismo de modificação de histona que irei descrever é ubiquitinação de histonas. Neste mecanismo o polipeptídeo ubiquitina liga-se às cadeias laterais do aminoácido lisina presente nas histonas por ação conjunta de três enzimas (*E1-activating*, *E2-conjugating* e *E3-ligating*) que formam um complexo enzimático que determina a que lisina o polipeptídeo se liga e o grau de ubiquitinação (mono ou poli-ubiquitinação). Este processo pode ser revertido por ação de isopeptidases, importantes na atividade e silenciamento de genes (Bannister e Kouzarides, 2011).

Apesar de ainda ser pouco claro em que locais das histonas ocorrem ubiquitinação, estas maioritariamente ocorrem nas histonas do “*core*”, H2A e H2B. A monoubiquitinação da lisina 119 da histona H2A (H2AK119ub1) está envolvida no silenciamento de genes

ao passo que a monoubiquitinação da lisina 123 da histona H2A (H2BK123ub1) é importante na iniciação da transcrição (Bannister e Kouzarides, 2011).

Os diferentes mecanismos de modificações de histonas apresentados podem formar diversas combinações, podendo ocorrer diversas modificações num só nucleossoma ou em diversos. O conjunto destas modificações podem desencadear diversas alterações, que se refletem na progressão celular, replicação e reparação do DNA, rearranjo do DNA, fenómenos de imprinting, estabilidade e identidade de cada cromossoma (Hake *et al.*, 2004; Bannister e Kouzarides, 2011).

Atualmente estão identificados dois mecanismos que explicam as diferentes consequências de modificações de histonas: (1) perturbação da estrutura de cromatina ou (2) recrutamento de proteínas aos vários locais onde ocorrem modificações de histonas (Kouzarides, 2007).

O primeiro mecanismo é comum na acetilação e fosforilação de histonas. No qual existe uma alteração da carga das histonas que modifica as interações eletrostáticas entre as histonas e o DNA, existe então o relaxamento da cromatina e o acesso dos fatores de transcrição ao DNA é facilitado (Bannister e Kouzarides, 2011). No segundo mecanismo existe o recrutamento de diferentes proteínas que se ligam aos locais onde ocorrem modificações de histonas. Geralmente estas proteínas apresentam um domínio específico de ligação que promove alterações catalíticas da estrutura da cromatina (Bannister e Kouzarides, 2011).

Logo, o perfil de modificações de histonas deve ser avaliado como um todo, uma vez que a resposta a estas modificações não depende apenas de uma modificação mas de várias modificações no mesmo ou em diferentes nucleossomas.

- METILAÇÃO DO DNA

A metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais abundante em eucariotas, sendo essencial na manutenção das funções celulares e desempenha um papel fulcral na regulação da expressão genética (Ho *et al.*, 2013; Auclair e Weber, 2012).

Este mecanismo epigenético ocorre principalmente em citosinas presentes nas sequências duplas de DNA. A metilação é catalisada por um conjunto de enzimas denominadas por metiltransferases que adicionam um grupo metilo ao carbono 5 das bases de citosina originando 5-metilcitosina, figura 6 (Auclair e Weber, 2012). A metilação do DNA ocorre principalmente em áreas do genoma denominadas por ilhas

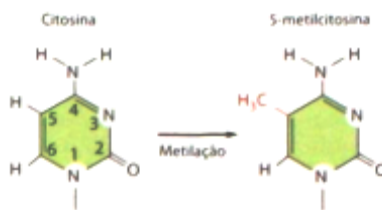


Figura 6 – Metilação de uma base citosina. Figura Baseada em Alberts *et al.*, (2010).

CpG, constituídas por resíduos de citosina seguidos de guanina, localizadas em regiões promotoras ou regiões reguladoras de genes específicos (Zeisel, 2009).

A metilação das citosinas geralmente é vista como uma marca repressiva que inibe a transcrição, impedindo a ligação dos fatores de transcrição ou recrutando proteínas que se ligam aos grupos metilo e alteram a estrutura da cromatina. Os padrões de metilação do DNA são estáveis e propagam-se ao longo das divisões celulares, a sua alteração por processos de hipometilação ou hipermetilação do DNA pode dar origem a diversas doenças (Auclair e Weber, 2012). Na hipermetilação os níveis de metilação são

elevados, diminuído ou anulando o acesso dos fatores de transcrição às regiões promotoras, inativando a transcrição. Por outro lado na hipometilação os níveis de metilação são reduzidos nas regiões promotoras aumentando a acessibilidade dos fatores de transcrição, ativando a transcrição (Ruemmele e Garnier-Lengliné, 2012)

Como referido anteriormente a metilação do DNA depende da ação de três tipos diferentes de metiltransferases: DNMT1, DNMT3a e DNMT3b (Zeisel, 2009). A DNMT1 é responsável por manter a metilação do DNA durante o processo de replicação e as metiltransferases DNMT3a e DNMT3b promovem a metilação *de novo* do DNA durante o desenvolvimento embrionário e a especialização celular. Ambas as proteínas (DNMT3a e DNMT3b) são semelhantes, mas apresentam alvos específicos distintos e originam padrões de expressão diferentes. A DNMT3b é prevalente em estágios embrionários iniciais e é a enzima responsável pela metilação do DNA durante a implantação do embrião, enquanto a DNMT3a é expressa em estágios embrionários posteriores e em células diferenciadas (Auclair e Weber, 2012). Qualquer mutação que ocorra nestas enzimas leva a desenvolvimento fetal anormal, imunodeficiência e um desenvolvimento anormal do cérebro (Zeisel, 2009).

No processo de formação do feto em mamíferos, os padrões de metilação têm um papel de elevada relevância. Durante este processo ocorre remetilação do DNA, processo que depende da informação genética recebida pelos progenitores e do ambiente a que o embrião está sujeito (Burdge e Lillycrop, 2010). Estudos em fêmeas de ratos em gestação demonstram que após a fecundação os níveis de metilação diminuem até à formação do blastocisto (Figura 7). Durante este período, até pouco antes da implantação do embrião, o genoma proveniente do pai sofre desmetilação rápida, enquanto o que é proveniente da progenitora é desmetilado progressivamente até a

formação do blastocisto. O processo de desmetilação descrito permite a ativação do programa de pluripotência nas células do embrião para posteriormente dar origem a diferentes células (Auclair e Weber, 2012).

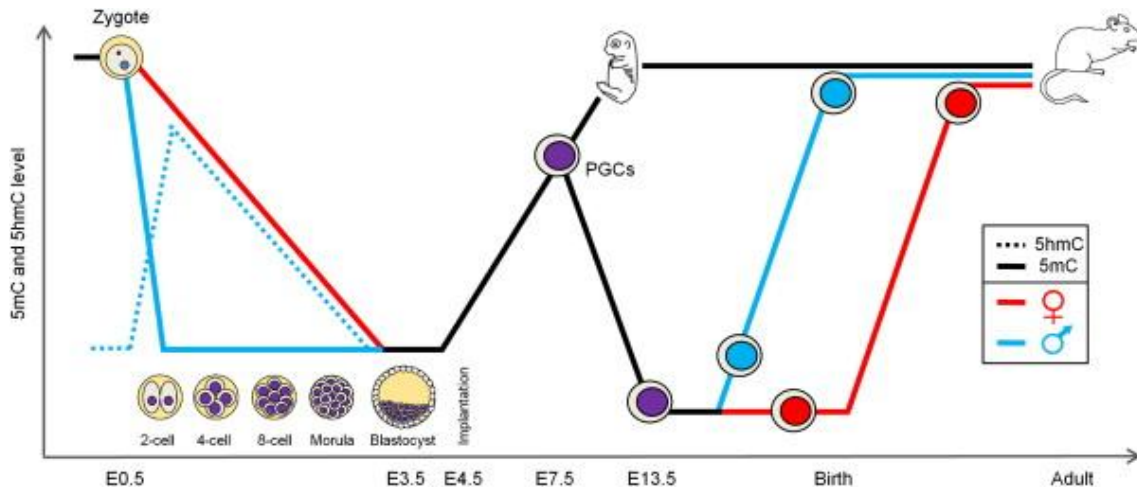


Figura 7 – Representação esquemática da reprogramação da metilação de DNA durante o desenvolvimento embrionário de ratos. Figura baseada em Auclair e Weber, 2012.

Após a implantação do embrião (Figura 7) são restabelecidos novos padrões de metilação por ação das metiltransferases DNMT3a e DNMT3b (Salbaum e Kappen, 2012). No mesmo período inicia-se a diferenciação celular que origina as diferentes células somáticas do embrião e as células germinativas primordiais (PGCs), que originam os espermatozoides ou os óvulos. As PGCs sofrem um segundo processo de desmetilação até ao dia 13.5 do estágio embrionário. De seguida sofrem uma nova remetilação que culmina quando estas células entram em meiose nas fêmeas ou mitose suspensa no caso dos machos (Auclair e Weber, 2012).

O perfil de metilação impresso nas células somáticas é transmitido ao longo das várias mitoses e mantidas por várias gerações de células ao longo da vida (Burdge e Lillycrop,

2010; Auclair e Weber, 2012). Estas alterações geralmente são estáveis e hereditárias (Kim *et al.*, 2009).

Diversos estudos em animais geneticamente modificados e estudos humanos indicam que as mudanças de metilação do DNA podem ocorrer durante o desenvolvimento uterino, como referido anteriormente, mas também durante as janelas de desenvolvimento crítico (adolescência). Podendo dar origem a diversas doenças em adultos (Monteiro *et al.*, 2014).

Um exemplo claro da importância da metilação do DNA ocorre em processo de *imprinting* genômico. O *imprinting* é um mecanismo comum em mamíferos que leva a uma expressão diferenciada dos alelos parentais, ou seja apenas um dos alelos herdados (materno ou paterno) é expresso. Diversos estudos efetuados têm demonstrado que muitos dos genes que sofrem *imprinting* desempenham relevantes funções no desenvolvimento e crescimento humano, influenciando igualmente a expressão de diferentes fenótipos (Kelsey e Feil, 2013).

Um dos exemplos mais bem documentados ocorre no gene *Igf2* (fator -2 de crescimento semelhante à insulina) o silenciamento deste gene durante o desenvolvimento do embrião inibe o crescimento pré-natal do feto. A metilação do DNA em regiões que controlam os processos de *imprinting* é diferente nos oócitos e espermatozoides. Após a fertilização a remetilação do DNA pode levar ou não à metilação destas regiões controlando assim qual dos alelos parentais é expresso. Caso se verifique a metilação das regiões que controlam o processo de *imprinting*, este é silenciado, levando à transcrição de ambos os alelos parentais e à produção desregulada da proteína que se associa a este gene (Kelsey e Feil, 2013).

-
- siRNA

Os RNAs desempenham um papel fundamental na regulação da expressão genética. Estes podem desempenhar diversos processos celulares sem dar origem a proteínas, sendo designados por pequenos RNAs não codificantes (ncRNAs – “*non coding RNAs*”) (Viegas *et al.*, 2007).

A pequena dimensão dos ncRNAs tem dificultado os avanços científicos nesta área. O aparecimento de novas tecnologias tem aumentado exponencialmente o conhecimento destes RNA e permitiram identificar diversas classes de ncRNAs, designadas por pequenos RNA de interferência (siRNAs) e microRNAs. Estes possuem capacidade de se ligarem a mRNAs complementares degradando-os ou regulando a sua tradução. Este mecanismo pode levar ao silenciamento de genes específicos (Viegas *et al.*, 2007).

Este subcapítulo está direcionado para as possíveis inferências que os siRNA podem efetuar e as suas características.

Os siRNAs são moléculas de aproximadamente 21 a 25 nucleotídeos de tamanho e com uma protuberância de 2 nucleótidos na extremidade 3` (Viegas *et al.*, 2007). Têm origem em moléculas de RNA de cadeia dupla (dsRNAs) que são processadas por uma enzima denominada Dicer (Nicholas, 2010). Após a formação dos siRNAs estes podem associar-se a dois complexos de silenciamento genético diferentes, complexo silenciador induzido por RNA (RISC – “*RNA-induced silencing complex*”) ou ao complexo de silenciamento transcricional induzido por RNA (RITS – “*RNA-induced transcriptional silencing complex*”). Ambos os complexos ribonucleoproteicos contêm proteínas da família Argonauta que se ligam diretamente aos pequenos siRNAs e moldam o silenciamento genético. Os complexos referidos ligam-se aos siRNAs de cadeia dupla e sofrem ativação após a clivagem das cadeias por helicases, processo

dependente de ATP. Apenas a cadeia *antisense* fica associada ao complexo e liga-se posteriormente a moléculas de RNA complementares (Viegas *et al.*, 2007; Alberts *et al.*, 2010).

No mecanismo de silenciamento genético induzido pelo RISC, este associa-se a um RNA mensageiro (mRNA) alvo com uma sequência de nucleótidos complementar (figura 8). Dependendo da extensão da ligação entre os dois RNAs (siRNA e mRNA) o complexo degrada diretamente o mRNA (ligação extensa) ou reprime a sua tradução ao destabilizar a sua conformação (ligação menos extensa).

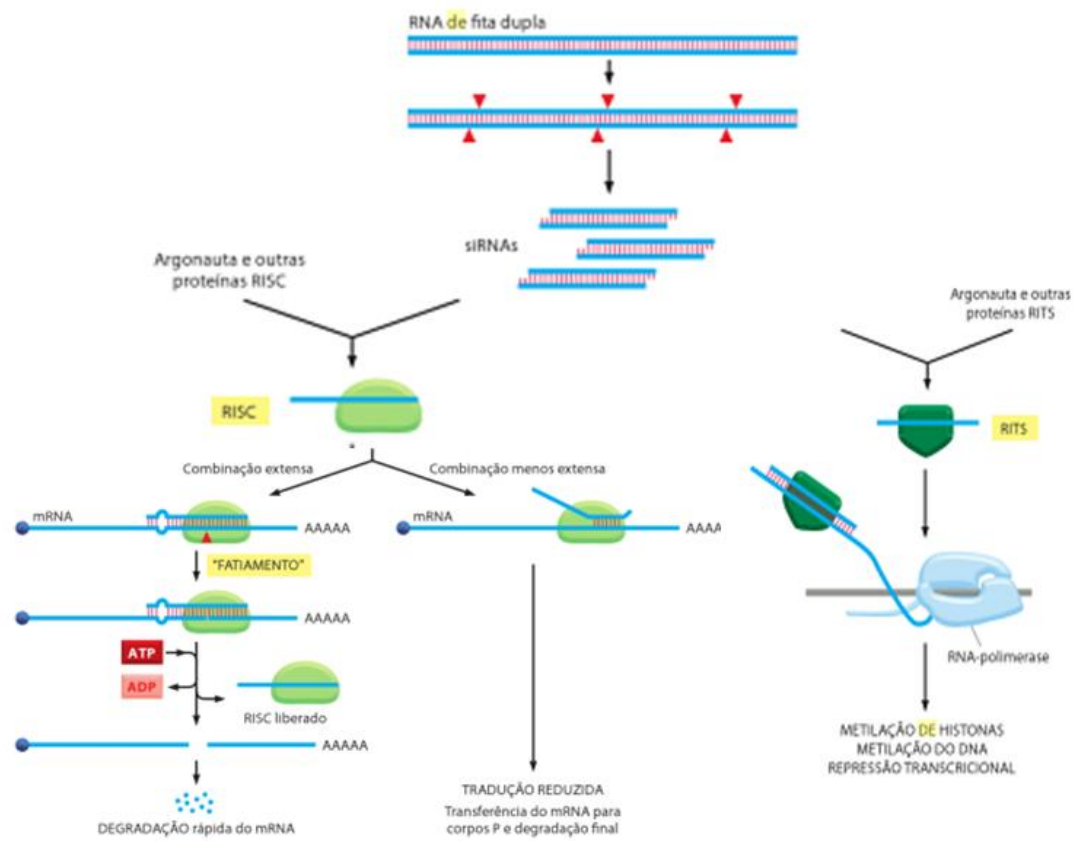


Figura 8 - Formação e mecanismos de acção dos siRNAs (Baseado em Alberts *et al.*, 2010).

O complexo RITS utiliza o siRNA como sequência guia para se ligar a RNAs complementares, imediatamente após a sua transcrição pela RNA polimerase II. Este complexo associa-se indiretamente ao genoma promovendo modificações na transcrição genética por metilação do DNA e de histonas, silenciando os genes específicos (metilação de DNA) ou alterações na conformação da cromatina (metilação de histonas) como indicado na figura 8 (Viegas *et al.*, 2007; Alberts *et al.*, 2010).

Tendo em conta que muitas das doenças humanas têm origem na expressão alterada de genes, os siRNAs têm um elevado potencial terapêutico podendo ser usados para silenciar genes responsáveis por doenças como o cancro (Xu e Wang, 2014). Os siRNAs terapêuticos são formados sinteticamente tendo em conta o gene patogénico alvo e aplicados sistemicamente ou diretamente no local de desenvolvimento da doença. Para esta terapia ser eficaz é necessário criar transportadores não virais multifuncionais que permitam o transporte dos siRNAs na circulação sanguínea até ao local alvo, protegê-los da degradação e depuração renal, melhorar a sua penetração nas células alvo e diminuir a sua degradação por endossomas (Zhou *et al.*, 2014).

São utilizadas diversas técnicas que permitem melhorar a performance terapêutica dos siRNAs: modificações químicas ou físicas. As modificações químicas ocorrem por conjugação de pequenas moléculas (ácido fólico), polímeros (PEG), anticorpos e peptídeos (transferrina), enquanto as físicas podem ser promovidas por encapsulamento em nanopartículas ou lipossomas. Em algumas doenças é característica a presença de recetores específicos para certos ligandos nos tecidos afetados, esta característica permite tornar as nanopartículas de siRNAs mais específicas com a adição de ligandos (anticorpos, peptídeos, pequenas moléculas...) compatíveis com os recetores. A transferrina é uma glicoproteína plasmática responsável pelo transporte de ferro no

sangue, é comum o recetor desta ser expresso em grande número na superfície das células de cancro de crescimento endógeno rápido, a conjugação da transferrina com nanopartículas de siRNA (figura 9) permite o encaminhamento dos siRNAs para as células cancerígenas promovendo o silenciamento dos genes responsáveis pelo desenvolvimento tumoral (Zhou *et al.*, 2014; Joo *et al.*, 2014).

No futuro será possível recorrer a este tipo de terapia de forma a minimizar os riscos e consequências de várias terapias convencionais no controlo de doenças como o cancro (Xu e Wang, 2014).

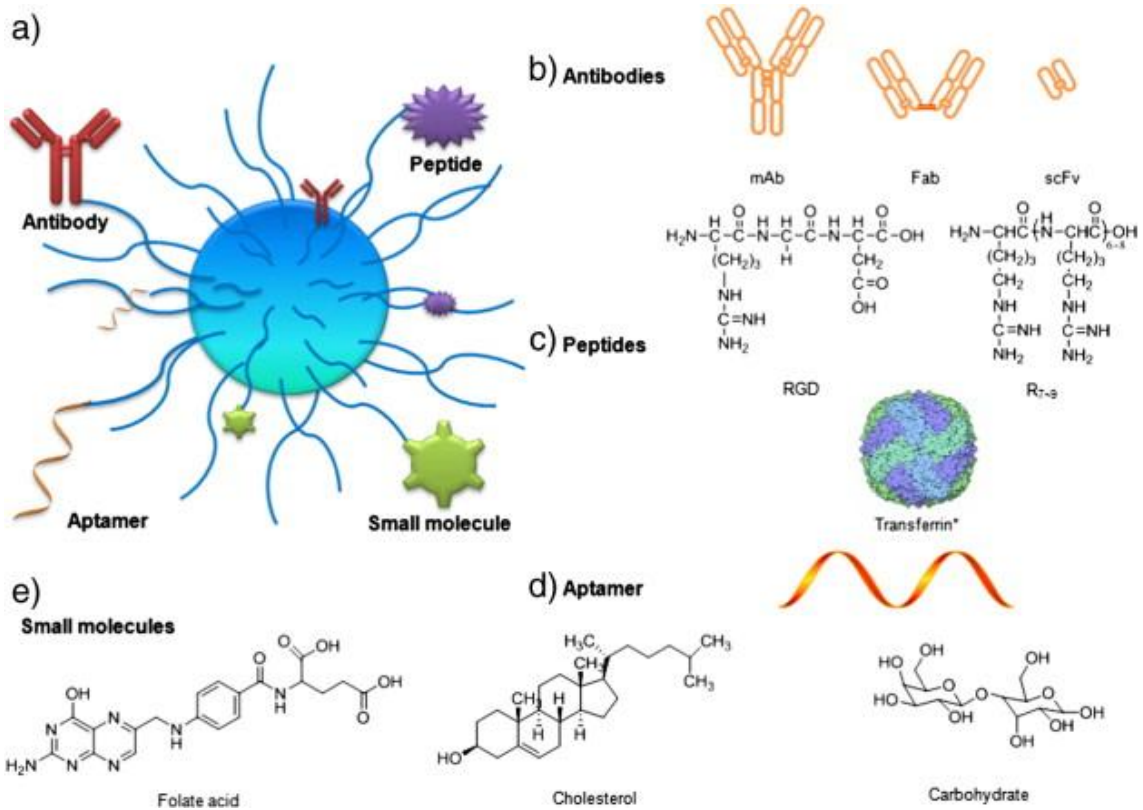


Figura 9 - Moléculas utilizadas como ligantes em nanopartículas siRNA de forma a facilitar o seu transporte sistémico (Zhou *et al.*, 2014).

3.3. Variação do número de cópias (CNV)

A conclusão do projeto genoma humano permitiu identificar novos fatores que promovem a variabilidade no genoma humano, como é o caso da variação do número de cópias (CNV) (Shelling e Ferguson, 2007).

Os CNV consistem numa sequência de DNA que apresenta um número variável de cópias em comparação com o genoma de referência (Almal e Padh, 2011). Foram já identificadas mais de 1500 regiões variáveis que representam cerca de 12% do genoma humano, sendo sugerido que a percentagem de nucleótidos que sofrem CNVs é aproximadamente igual ou superior ao número de nucleótidos afetados por SNPs (Shelling e Ferguson, 2007; Almal e Padh, 2011; MacDonald *et al.*, 2014).

O mecanismo que dá origem a CNVs ainda não é completamente conhecido, no entanto sabe-se que estas podem ser estáveis e de carácter hereditário, surgindo espontaneamente durante a meiose (Almal e Padh, 2011). Os CNVs estão associados a mecanismos de deleção, duplicação, duplicação de seguimento, inserção, inversão e translocação, afetando quantitativamente a expressão genética, sem anular a função do gene (Almal e Padh, 2011).

Os CNVs permitem modular a expressão genética e consequentemente o fenótipo associado à doença (Figura 10), tendo sido detetadas associações a doenças cardiovasculares, metabólicas (por ex. diabetes tipo II, obesidade) distúrbios neurológicos (por ex. Parkinson, alzheimer), cancro, entre outros (Almal e Padh, 2011; Girirajan *et al.*, 2011).

Um exemplo de como as CNVs podem afetar a expressão de diferentes fenótipos ocorre no gene responsável pela produção da amílase salivar (AMY1 – “*salibary amylase gene*”). Um estudo efetuado correlaciona o metabolismo dos hidratos de carbono e a

obesidade, concluindo que uma diminuição do número de cópias do gene AMY1 resulta na diminuição dos níveis de amilase salivar e num aumento do risco de obesidade (Falchi *et al.*, 2014).

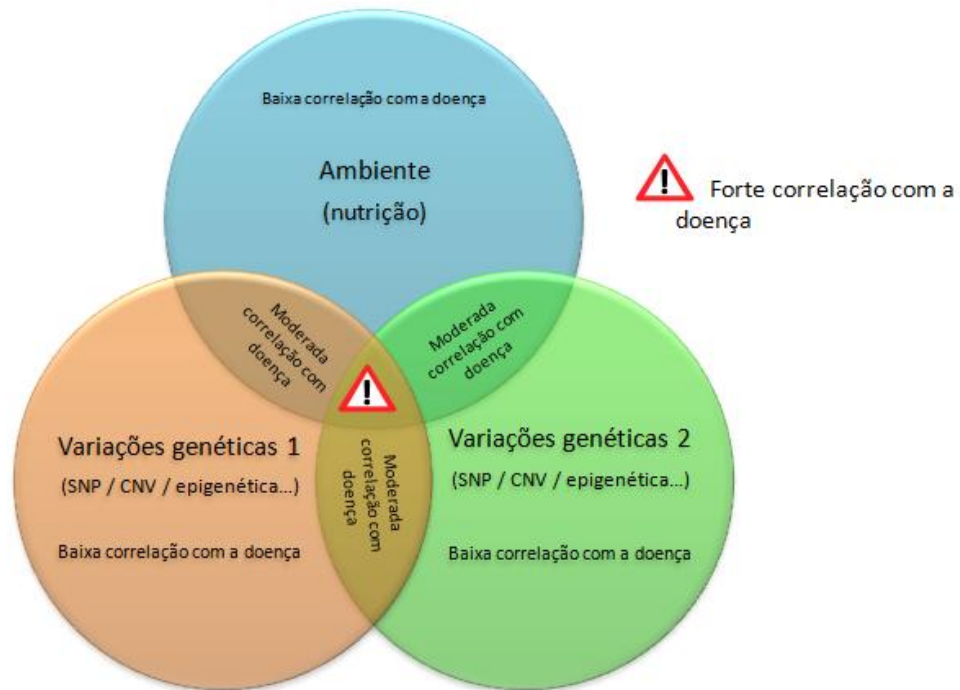


Figura 10 - Variações genéticas e a suscetibilidade para o desenvolvimento de doença. A representação esquematiza a forte correlação entre várias variações genéticas (SNP, CNV, epigenéticas) e o possível envolvimento de fatores ambientais, que incluem a nutrição, na suscetibilidade à doença. Baseado (Almal e Padh, 2011).

4. Ciências “*omics*” e a nutrigenômica

Para compreender a interação entre nutrientes e genes é necessário recorrer às ciências “ômicas”. Estas permitem perceber o papel da nutrição na prevenção de doenças (Trujillo *et al.*, 2006).

Nos últimos séculos existiram grandes avanços científicos que permitem correlacionar as interações existentes entre genes e nutrientes. Atualmente vivemos na “Era pós-genômica” que responde a problemas integrados aos níveis da biologia, ciências sociais e ambientais (Neeha e Kinth, 2013; Sales *et al.*, 2014), num fluxo de trabalho em que a bioinformática tem um papel crucial na análise e interpretação dos dados obtidos pelas ciências “ômicas”, já que estas envolvem enormes fluxos de informação relacionados com a caracterização precisa e extensa da totalidade de um grande número de biomoléculas (DNA, RNA, proteínas e metabolitos).

O desenvolvimento de diversas ciências como a proteômica, metabolômica e transcritômica, permitiu criar ferramentas revolucionárias que auxiliam a nutrigenômica (Sales *et al.*, 2014). Estas novas ciências permitem estudar a influência dos compostos dietéticos sobre o genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma (Astarita e Langridge, 2013). Apenas será possível compreender como o nutriente pode interferir em todos os componentes celulares, recorrendo a diversos estudos que possam ser várias vezes reproduzidos e recorrendo a diversas campos científicos como a nutrição, medicina, genômica e bioinformática (Sales *et al.*, 2014).

Os fatores dietéticos contribuem para a expressão de vários fenótipos, compreender como estes fatores atuam sobre a expressão genética não depende apenas da avaliação do conjunto de mutações que ocorrem no DNA (Figura 6) (Trujillo *et al.*, 2006). Logo a combinação das informações obtidas através da genômica, epigenômica, proteômica,

metabolómica e bioinformática juntamente com a nutrigenómica, permitiram compreender as vantagens de dietas personalizadas na saúde de cada indivíduo (Masotti *et al.*, 2010).

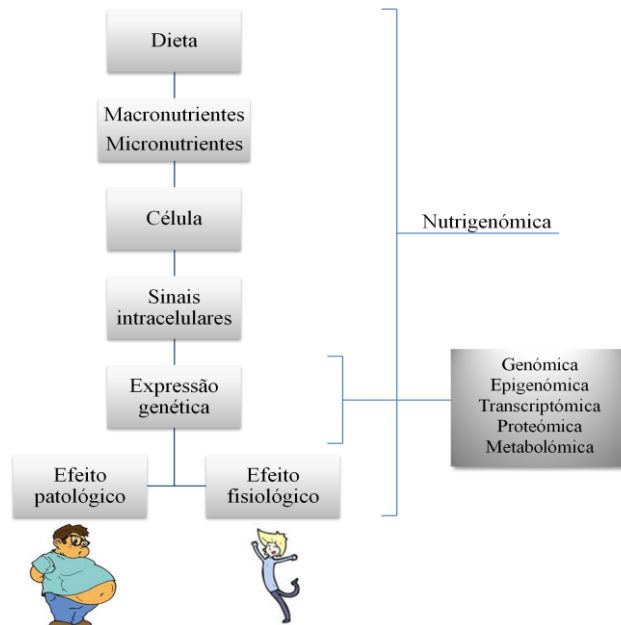


Figura 11 - O fluxograma representa as diferentes etapas envolvidas na expressão genética e as tecnologias utilizadas para analisar cada etapa e os efeitos na saúde humana. Baseado em Constantin e Wahli, 2013 e Masotti *et al.*, 2010.

4.1. Transcriptômica

A transcriptômica estuda o conjunto das transcrições moleculares de mRNA ativadas numa determinada célula. (Sales *et al.*, 2014).

O conjunto destas moléculas é produzido em momentos e tecidos específicos por um processo designado por transcrição e sob a influência de fatores de transcrição. Os fatores de transcrição quando ativados migram para o núcleo e ligam-se a uma sequência de DNA na região promotora, onde inibem ou ativam a transcrição. Estes podem ser estimulados por sinais fisiológicos, desencadeados por nutrientes e

compostos bioativos presentes em alimentos, por metabolitos ou por hormonas, tratamentos farmacológicos e doenças (Sales *et al.*, 2014).

Na nutrigenómica a transcriptómica pode ajudar a identificar genes, proteínas ou metabolitos. Auxiliando no reconhecimento e caracterização das vias nas quais os nutrientes ou compostos bioativos têm uma ação reguladora do genoma (Sales *et al.*, 2014). A regulação da taxa de transcrição de genes por componentes alimentares, tem um papel importante na expressão do fenótipo de cada indivíduo (Trujillo *et al.*, 2006).

Os microarrays são uma das principais ferramentas da transcriptómica e permitiram obter novas informações de como os diferentes fatores nutricionais afetam fisiologicamente um organismo (Neeha e Kinth, 2013). Estes tornam as experiências desta área menos morosas, uma vez que permitem quantificar todos os genes presentes no genoma humano num único ensaio (Vergères, 2013).

Um exemplo de como a transcriptómica pode ser utilizada em estudos de nutrigenómica ocorre em ratinhos sujeitos a uma dieta de restrição calórica. Esta intervenção nutricional demonstra claramente que existe um aumento do tempo de vida dos ratinhos (Vergères, 2013). A análise transcriptómica que ocorre nesta experiência utiliza como órgão alvo o timo, avaliando as alterações que ocorrem na expressão de um conjunto de genes durante o envelhecimento. Em várias espécies, incluindo os humanos e roedores, durante o envelhecimento verifica-se uma diminuição de produção de células T no timo, afetando o sistema imunitário. Nesta experiência verificou-se que os ratos colocados em restrição calórica durante o processo de envelhecimento apresentam um transcriptoma do timo semelhante ao de ratinhos jovens, existe uma reversão do sistema imunitário que permite prolongar e melhorar a vida dos ratinhos. Os resultados obtidos não podem ser validados à biologia humana uma vez que não são totalmente conhecidos os efeitos

colaterais da restrição calórica nos modelos animais e em humanos. Mas é comprovado com esta experiência, que existe uma correlação entre o fenótipo dos ratinhos (tempo de vida) e a influência da nutrição sobre o envelhecimento do sistema imune (Vergères, 2013).

4.2. Proteômica

As proteínas são moléculas presentes em todas as células vivas, têm diversas funções bioquímicas (sinalização, transporte, armazenamento, entre outras) e fazem parte da dieta humana (Sales *et al.*, 2014)

A proteômica é a ciência que estuda o conjunto de todas as proteínas, envolvidas nos processos celulares de uma determinada espécie, denominado por proteoma (Trujillo *et al.*, 2006). A forma como as proteínas atuam numa célula, tecido ou órgão, em diferentes situações fisiológicas ou patológicas, podem alterar o nível de expressão ou mesmo a atividade de um determinado gene (Sales *et al.*, 2014).

Em comparação com os ácidos nucleicos (na transcriptômica) as proteínas são mais difíceis de caracterizar num modo de alto rendimento. Devido à sua complexidade química (possuem 20 aminoácidos em comparação com as 4 bases que formam os ácidos nucleicos) físico-química (possuem estruturas secundárias terciárias e quaternárias, podem ser solúveis ou insolúveis e podem estar ligadas a membranas) e bioquímicas (estão sujeitas a modificações pós-traducionais) (Vergères, 2013).

A proteômica surge como uma ferramenta essencial para a nutrigenômica permitindo descrever como a dieta interfere no genoma humano. Determinando a bioeficácia de uma dieta através da quantificação e identificação de proteínas e peptídeos bioativos presentes no organismo após a sua ingestão (Kussmann *et al.*, 2010).

As tecnologias proteômicas, como a eletroforese em gel de poliacrilamida, cromatografia líquida de alto desempenho e espectrometria de massa, permitem apenas identificar uma pequena fração da população de proteínas presentes no organismo humano. Mas ao serem identificadas as proteínas envolvidas nos processos nutrigenômicos estas tecnologias facilitam a sua compreensão (Neeha e Kinth, 2013; Vergères, 2013).

A aplicação da proteômica no campo da nutrigenômica pode ser ilustrada por uma investigação efetuada sobre o possível mecanismo que permite atenuar o desenvolvimento de cancro do cólon utilizando resveratrol (Vergères, 2013).

A análise proteômica foi realizada em células do cancro do cólon humanas cultivadas na ausência ou na presença de fatores de crescimento tumorais e resveratrol. Esta análise permitiu identificar as proteínas que interferem nas várias vias de desenvolvimento do cancro (apoptose, remodelação do citoesqueleto, progressão do ciclo celular e adesão celular). Foi identificada uma proteína, denominada por talina que regula o citoesqueleto das células cancerígenas. Verificou-se que a sua expressão aumenta em células do cancro do cólon cultivadas na presença de fatores de crescimento e permanece ao nível basal após a aplicação de resveratrol no meio de cultura (Vergères, 2013).

Estudos semelhantes a este permitem identificar biomarcadores proteicos que podem ser utilizados *in vivo* na avaliação do potencial terapêutico ou preventivo de dietas ou suplementos com resveratrol no cancro do cólon. Bem como a eficácia de outras substâncias bioativas e nutrientes em várias outras doenças (Vergères, 2013; Neeha e Kinth, 2013).

4.3. Metabolómica

A metabolómica estuda o metaboloma. Este consiste no conjunto de metabolitos primários e secundários presentes nos fluidos intra e extracelulares de um organismo vivo (Sales *et al.*, 2014).

Os metabolitos são o produto final da expressão genética e dos vários processos regulatórios fisiológicos. Qualquer alteração na sua concentração pode indicar alterações importantes no estado bioquímico de sistema biológico (García-Cañas *et al.*, 2010).

Existem diferentes tipos de metabolitos com propriedades hidrófilas (nucleótidos, aminoácidos e hidratos de carbono) ou hidrofóbicas (maioria dos lípidos) (Astarita e Langridge, 2013). Estes também podem ser divididos em metabolitos primários e secundários, os primeiros estão diretamente envolvidos com as vias de síntese e degradação de macromoléculas e os segundos são mais comuns em plantas e fungos, agindo como componentes estruturais de defesa. Os metabolitos podem atuar como substratos que inibem ou ativam a atividade enzimática, como precursores moleculares, como resíduos de síntese ou degradação de macromoléculas, entre outros (Sales *et al.*, 2014).

A metabolómica pode utilizar diferentes abordagens para avaliar os metabolitos. Fazer uma análise quantitativa de metabolitos específicos utilizados por exemplo como biomarcadores; caracterizar um grupo de metabolitos interrelacionados e provenientes de vias metabólicas específicas que originam determinados fenótipos ou comparar as respostas celulares obtidas a diferentes padrões de metabolitos (García-Cañas *et al.*, 2010).

A nutrigenômica utiliza a metabolômica para estudar as alterações metabólicas produzidas por nutrientes ou compostos bioativos nas diferentes vias metabólicas. Os metabolitos (como por exemplo o colesterol ou a glicose) são utilizados como biomarcadores que indicam o estado de saúde ou doença (Astarita e Langridge, 2013; García-Cañas *et al.*, 2010).

Nos estudos de metabolômica em nutrigenômica são utilizados fluidos corporais (sangue ou urina) como amostras. Os metabolitos são extraídos das amostras e separados por técnicas de cromatografia líquida de alto desempenho, eletroforese capilar ou cromatografia gasosa. Sendo posteriormente identificados por espectrometria de massa ou ressonância magnética nuclear. O passo final destes estudos é identificar e determinar a importância biológica dos metabolitos, recorrendo a bases de dados internacionais disponíveis *on line*. Como por exemplo a base de dados da Organização Europeia da Nutrigenômica que disponibiliza informação de um grande número de metabolitos humanos (García-Cañas *et al.*, 2010).

A metabolômica permite compreender os mecanismos metabólicos e instabilidades que podem ter origem numa determinada dieta, permitindo compreender como o excesso ou falta de alguns nutrientes ou compostos presentes nos alimentos podem afetar a saúde ou a doença de um indivíduo. (Sales *et al.*, 2014)

4.4. Epigenômica

A epigenética estuda as alterações na expressão genética, que ocorrem sem existir alterações na sequência de DNA, denominadas por alterações epigenéticas. O conjunto destas alterações forma o epigenoma o qual é estudado pela epigenômica. (Gueant *et al.*, 2013).

O epigenoma consiste na combinação de várias modificações – metilação do DNA, modificação de histonas e RNA não codificantes - que ocorrem em células ou tecidos num determinado momentos, moldando a acessibilidade dos fatores de transcrição aos genes (Salbaum e Kappen, 2012; Sales *et al.*, 2014). Este é duplicado como o genoma durante a divisão e diferenciação celular. Podendo sofrer algumas alterações que dão origem a novos padrões de expressão genética, que se adaptam consoante as necessidades celulares (Scarino, 2008).

Inicialmente acreditava-se que estas alterações não tinham uma componente hereditária, atualmente está comprovado que podem ser “herdadas” não só dos nossos pais mas também dos nossos avós. Podem surgir ao longo da vida ou também durante o período embrionário, consoante as condições a que o embrião está sujeito. (Tammen *et al.*, 2013).

Uma demonstração de como o epigenoma pode sofrer alterações em vários estágios da vida, resultou da comparação do epigenoma de gémeos monozigóticos. O epigenoma analisado revelou que os padrões de metilação de DNA e acetilação de histonas divergem à medida que envelhecem, logo a mesma informação genética presente nos gémeos pode ser diferencialmente modulada durante a vida adulta, explicando a discordância fenotípica que se observa em gémeos idênticos ao longo das suas vidas (Scarino, 2008).

4.5.Folato e epigenoma

Todas a alterações epigenéticas podem ter um carácter reversível ao longo da vida de um indivíduo, utilizando por exemplo dietas personalizadas (Sales *et al.*, 2014). Com efeito os componentes bioativos dos alimentos podem desencadear alterações

epigenéticas que dificultam a compreensão de quais os genes ativados durante a interação nutriente-gene e como a dieta pode influenciar processos biológicos e fenótipos (Trujillo *et al.*, 2006).

Vários compostos presentes nos alimentos podem modificar ou marcar o genoma, de forma a moldar a atividade celular. Isto ocorre por alteração das denominadas marcas epigenéticas, e determina a função da célula e onde e quando esta deve iniciar as suas funções. Estas alterações podem ser mais ou menos pronunciadas, mas todas as alterações que ocorrem no epigenoma podem alterar o fenótipo de cada indivíduo, modificando por exemplo a propensão para uma doença crónica (Sales *et al.*, 2014).

Várias modalidades moleculares do epigenoma dependem de reações de metilação, logo torna-se indispensável compreender a ligação existente entre o folato e epigenoma (Monteiro *et al.*, 2014).

A S-adenosilmetionina (SAM) é um dador direto de grupos metilo para mais de 200 reações em que estão subjacentes metiltransferases (DNMT), que atuam em processos de metilação de DNA, RNA e metabolitos (Monteiro *et al.*, 2014). O fornecimento de SAM depende da formação de metionina a partir de homocisteína, reação que por sua vez depende principalmente da disponibilidade de 5-metiltetrahydrofolato. Esta dependência estabelece uma ligação direta entre a disponibilidade do nutriente folato e as modificações epigenéticas que ocorrem, e por sua vez, interfere na regulação de genes e expressão de fenótipos relacionados com a saúde ou doença (Salbaum e Kappen, 2012).

A deficiência de folato pode levar a alterações no epigenoma, nomeadamente no processo de metilação de DNA. As células que se encontram em rápida proliferação exigem uma elevada atividade das DNMT, principalmente DNMT1, sendo necessário

um elevado aporte de substratos doadores de metilo, como se verifica ao longo do desenvolvimento embrionário, na hematopoiese ou na proliferação celular que ocorre durante uma resposta imunitária (Salbaum e Kappen, 2012). Logo a informação epigenética pode ser rapidamente diluída podendo causar o silenciamento de genes e levar a uma expressão ectópica.

O potencial que os nutrientes têm para alterar o fenótipo, pode ser demonstrado com o auxílio de modelos experimentais, como os ratos Agouti. Dependendo da dieta materna (alta ou baixa em folato e vitamina B12) aplicada no período pré-gestacional, durante a gestação ou mesmo durante o período de lactação, leva a alterações no fenótipo das crias, devido a modificações epigenéticas.(Ruemmele e Garnier-Lengliné, 2012)

O alelo A^{vy} (*agouti viable yellow*) possui acima do gene agouti uma partícula intracistrenal A (IAP – *intracisternal A particle*). O IAP é um retrotransposão abundante em mamíferos e contém o promotor que regula a expressão do gene agouti. O nível de metilação do promotor oculto no IAP é determinado durante o desenvolvimento embrionário e pode ser moldado pela nutrição materna ou por outros agentes ambientais que incluem desreguladores endócrinos e componentes tóxicos, com indica a figura 12 (Burdge e Lillycrop, 2010). A metilação das CpGs desta área leva a expressão de diferentes fenótipos, os ratinhos podem apresentar uma pelagem amarela quando não existe metilação do IAP ou pelagem de cor castanha (tipo selvagem – *wild type*, como indicado na figura 12) quando se verifica a metilação do IAP (Ruemmele e Garnier-Lengliné, 2012).

O estudo em modelos agouti ilustrado pela figura 12 demonstram a importância da suplementação de ácido fólico e vitamina B12 durante a gestação e como estes nutrientes originam diferentes alterações epigenéticas (Burdge e Lillycrop, 2010).Os

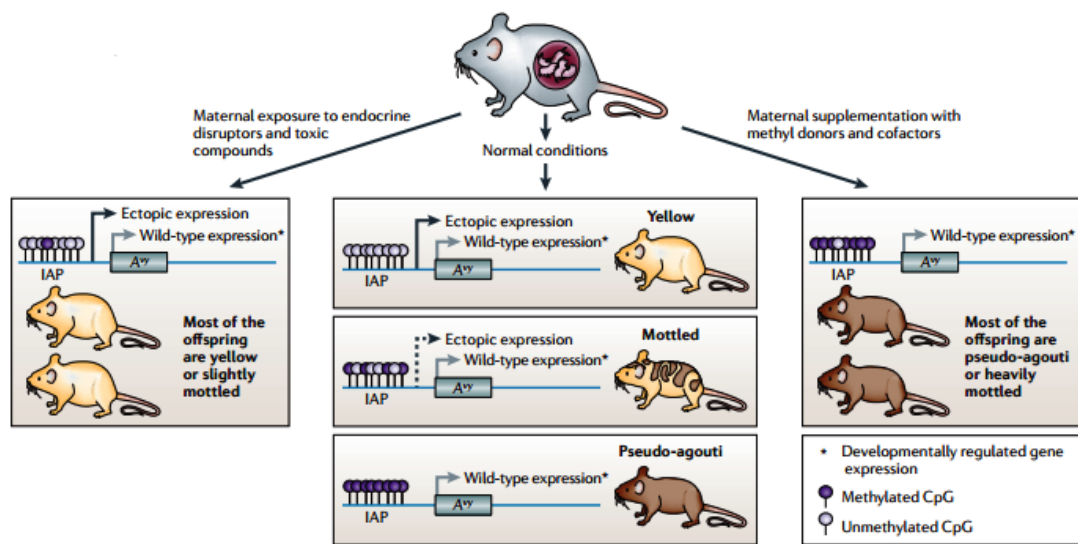


Figura 12 - Figura ilustrativa das possíveis alterações na expressão do gene agouti e os vários fenótipos expressos na prole de ratinhos, dependendo da suplementação alimentar que a progenitora é sujeita durante o período gestacional (Feil e Fraga, 2012)

ratinhos fêmea em gestação que não tiveram uma dieta suplementada com ácido fólico e vitamina B12 e estiveram sujeitas a condições adversas (desreguladores endócrinos ou componentes tóxicos), têm crias com uma pelagem de cor amarela de maior tamanho e com maior propensão para desenvolver obesidade, diabetes e cancro em idade adulta. Neste caso durante a formação das células do feto não existe metilação do IAP e o promotor oculto no seu interior é ativado levando à expressão ectópica do gene agouti (Burdge e Lillycrop, 2010; Feil e Fraga, 2012). Por outro lado as fêmeas saudáveis sujeitas a dieta rica em ácido fólico e vitamina B12 dão à luz ratinhos castanhos e saudáveis. A suplementação com estas substâncias durante o desenvolvimento uterino promovem a metilação do IAP, tornando o promotor do gene agouti inacessível e consequentemente é expresso o fenótipo selvagem (Burdge e Lillycrop, 2010; Feil e Fraga, 2012). Por fim é ilustrado que ratinhos fêmea saudáveis não sujeitos a suplementação podem ter crias que apresentam um dos fenótipos referidos

anteriormente ou possuir uma pelagem amarela com manchas castanhas. Verifica-se esta situação quando o IAP não é totalmente metilado, levando à expressão de ambos os fenótipos (Feil e Fraga, 2012).

Logo podemos concluir que a cor da pelagem e a suscetibilidade á doença em ratos Agouti são afetadas pela dieta das mães (Trujillo *et al.*, 2006).

5. Desafios e perspectivas da nutrigenómica

A nutrigenómica, com o objetivo de compreender como a nutrição influencia as vias metabólicas e a homeostasia do organismo (Afman e Muller, 2012) estuda as formas como os nutrientes e compostos bioativos dos alimentos afetam direta ou indiretamente a expressão do genoma e seus reflexos na suscetibilidade a várias doenças, como a obesidade, cancro, doenças cardiovasculares e diabetes (Garg *et al.*, 2014). É assim expectável que os avanços em Nutrigenómica venham a potenciar a identificação de biomarcadores nutrigenómicos, com importância na previsão ou rastreio de doenças crónicas, promovendo assim a saúde e o aumento da qualidade de vida (Masotti *et al.*, 2010; Van Ommen e Stierum, 2002).

Os exemplos que se seguem ilustram as possíveis aplicações da nutrigenómica no cancro e doenças cardiovasculares.

Os padrões dietéticos podem modular o desenvolvimento do cancro. Existe uma crescente base de evidências que indicam que vários alimentos ou compostos bioativos alimentares podem reduzir o risco de cancro como indicado na tabela 2 (Greenwald e Milner, 2006). Por exemplo, o licopeno reduz o risco de cancro da próstata, como revelado em ensaios clínicos e em modelos experimentais em animais. Esta redução do risco de cancro da Próstata pode estar relacionado com a sua ação como antioxidante, a qual interfere com os recetores dos fatores de crescimento tumorais e com a progressão do ciclo celular (Greenwald e Milner, 2006).

Tabela 2 – Exemplos de componentes bioativos dos alimentos que podem modificar o risco de vários câncros (Greenwald e Milner, 2006).

Food source	Class of compound	Bioactive food component (s)
Cruciferous vegetables (arugula, Bok choy, broccoli, Brussels sprouts, cauliflower, collard greens, kale, mustard greens, radishes, rutabaga, turnips)	Isothiocyanate	Benzyl isothiocyanate, 2-phenethyl isothiocyanate, sulforaphane, allyl isothiocyanate, 3-methylsulfinylpropyl isothiocyanate
Vegetables	Glycosinolate	Indole-3-carbinol, 3,3'-diindolylmethane, indole-3-acetonitrile
	Minerals	Calcium, zinc, selenium
Dark green vegetables (spinach, kale)	Flavonoids	Quercetin, rutin
	Vitamins	Folic acid, vitamin A, vitamin E, vitamin C
Vegetables, fruits, black tea	Carotenoids	Lutein
Onions, garlic, scallions, chives	Vitamins	Vitamin A, vitamin C
Citrus fruit	Flavonoid	Anthocyanins
	Allium compounds (Organosulfur compounds)	Diallyl sulfide, allylmethyl trisulfide, allyl mercaptan, S-allylcysteine
Citrus fruit (peel), caraway seed oil	Terpenoid	Tangeretin, nobiletin, rutin
Berries, tomatoes, potatoes, broad beans, broccoli, squash, onions	Monoterpenes	D-Limonene, perillyl alcohol, geraniol, menthol, carvone
	Flavonoid	Quercetin
Radish, horse radish, kale, endive	Flavonoid	Kaempferol
Tea, chocolate	Polyphenol	Epigallocatechin gallate, epigallocatechin, epicatechin, catechin
Grapes, red wine	Polyphenol	Resveratrol, catechin
Tumeric, curry, mustard fruits, coffee beans, soybeans	Polyphenol	Curcumin, caffeic acid
Strawberries, raspberries, blackberries, walnuts, pecans	Polyphenol	Caffeic acid, ferulic acid, ellagic acid
Cereals, pulses (millet, sorghum, soya beans)	Isoflavone	Genistein
Orange vegetables and fruit	Carotenoid	α - and β -carotene
Tomatoes	Carotenoid	Lycopene
Tea, coffee, cola, cacao (cocoa and chocolate)	Methylxanthines	Caffeine, theophylline, theobromine
Dairy products (milk, cheese, yogurt)	Vitamins	Vitamin D, calcium
Red meat	Vitamins	Iron

Também em doenças cardiovasculares como a hiperlipidemia, os estudos nutrigenômicos têm um papel a desempenhar, esclarecendo como as variações que ocorrem nos genes das aloproteínas podem ser suscetíveis a intervenções dietéticas específicas. Com efeito, estudos em mulheres demonstraram que consoante o alelo expresso do gene estas têm diferentes respostas ao consumo de ácidos gordos polinsaturados, variando a suscetibilidade para desenvolver doenças cardiovasculares (Bhatt e Sharma, 2011).

Com a descoberta dos genes responsáveis pelo desenvolvimento das várias doenças referidas será possível à nutrigenómica descobrir que nutrientes possuem a capacidade de moldar a sua expressão de forma a prevenir ou controlar o desenvolvimento dos

vários estágios da doença. Uma meta-análise dos vários resultados permitirá criar biomarcadores que facilitarão a identificação das doenças e quais as dietas mais adequadas a cada caso, designadas por dietas personalizadas (Bhatt e Sharma, 2011). O desenvolvimento destas dietas depende de diferentes fatores, como a variabilidade genética entre indivíduos e o tempo e duração da exposição ao nutriente (Constantin e Wahli, 2013).

Um dos maiores desafios da nutrigenómica é especificar os contributos e o potencial de cada nutriente, bem como encontrar a melhor maneira de os combinar, garantindo a otimização das funções do organismo consoante interação dos nutrientes com o ambiente genético de cada indivíduo (Constantin e Wahli, 2013). Deverá, desta forma, ser possível desenvolver produtos alimentares e um aconselhamento dietético adaptado às necessidades nutricionais de cada indivíduo ou grupos específicos de consumidores (Ghosh, 2010). Ainda que este objetivo esteja ainda muito longe de ser atingido, a nutrigenómica permitiu já abrir novas perspetivas e oportunidades na indústria alimentar, como as sumariadas na figura 13 (Constantin e Wahli, 2013).

Os avanços na área nutricional que a nutrigenómica promoveu têm levantado diversas questões no âmbito ético, legal e social. Com efeito, os consumidores apresentam grande relutância relativamente à possibilidade de existirem produtos com a designação de nutrigenómica nas prateleiras dos supermercados, uma vez que associam estes produtos a manipulação genética dos mesmos. Por outro lado a aceitação torna-se maior quando estes produtos são apresentados por clínicos nutricionais, aumentando assim a confiança e credibilidade dos produtos (Ghosh, 2010).

Desenvolvimento da indústria alimentar

Alimentos funcionais	Qualidade alimentar	Agricultura / Plantações
<ul style="list-style-type: none">-Utilização de matrizes alimentares (lacticínios, farinhas) enriquecidas com combinações de nutrientes que promovam a saúde;-Nutracêuticos: combinações micronutricionais em forma de pó, comprimidos, etc.	<ul style="list-style-type: none">- Novos standards de qualidade- Processos industriais inovadores.	<ul style="list-style-type: none">- Seleção genómica de plantas altamente nutricionais.- Seleção genómica em gado para produzir produtos de origem animal de alta qualidade.

Figura 13 - Novas abordagens da indústria que podem surgir com os novos desenvolvimentos nutrigenómicos. Baseado (Constantin e Wahli, 2013)

Outras questões que se colocam com os novos avanços nutrigenómicos relacionam-se com a forma como estas tecnologias estarão disponíveis ao público em geral no futuro e como os profissionais de saúde poderão adaptar-se aos novos desenvolvimentos. Será possível integrar esta nova área nos serviços nacionais de saúde de forma a garantir que toda a população tem direito aos mesmos cuidados ou tornar-se numa área de saúde apenas disponível para as classes económicas superiores? Vários estudos efetuados entre os profissionais de saúde (clínicos gerais, farmacêuticos, nutricionistas) demonstram que os avanços que têm sido feitos são desconhecidos para estes profissionais os quais não se sentem devidamente creditados para passar a desempenhar esta nova função nos seus postos de trabalho. Contudo, os mesmos profissionais também acreditam que a nutrigenómica se tornará uma área de importante relevância no combate a vários tipos de doenças e que melhorará o estado de saúde da população em geral (Cormier *et al.*, 2014). Assim, parece evidente que a implementação da nutrigenómica na área da saúde e da indústria alimentar, implicará um significativo

esforço de formação dos profissionais ligados a estas áreas, e que do resultado deste esforço dependerá a aceitação de produtos e recomendações inovadoras de cariz Nutrigenómico por parte do público em geral .

6. Conclusão

A nutrigenômica pretende criar novas estratégias nutricionais de forma a melhorar a saúde de cada indivíduo tendo em conta as necessidades individuais ou de grupos de indivíduos, de forma a prevenir doenças relacionadas com a dieta.

Os estudos nutrigenômicos procuram analisar as substâncias contidas nos alimentos que podem afetar diretamente ou indiretamente o genoma humano, alterando a sua estrutura e expressão. Procuram assim, determinar de que forma a dieta pode ser um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças crónicas e quais os genes influenciados que determinam o início, incidência, progressão e severidade dessas doenças.

Os estudos nutrigenômicos permitiram também confirmar a teoria de Lamarck, segundo a qual o ambiente pode moldar o genótipo de modo transmissível à descendência, promovendo a evolução. A teoria de Lamarck surgiu muito antes de poder ser geneticamente fundamentada tendo sido fortemente contestada e substituída pela teoria da seleção natural de Darwin. Contudo, os recentes desenvolvimentos da Epigenética e da Nutrigenômica, aqui sistematizados, permitiram comprovar que em algumas situações, a teoria de Lamarck é a que melhor descreve a realidade objetiva.

Em suma a nutrigenômica, apesar de ser uma ciência muito jovem, permitiu já alterar de modo significativo alguns paradigmas, e promete no futuro próximo alterar os modelos de diagnóstico e terapêutica e promover estados de saúde, recorrendo a dietas personalizadas que diminuem o risco ou retardam a sintomatologia de doenças crónicas como a diabetes e doenças coronárias, entre outras.

7. Bibliografia

- Afman, L. A. e Muller, M. (2012). Human nutrigenomics of gene regulation by dietary fatty acids. *Progress in lipid research*, 51, pp. 63-70.
- Almal, S. H. e Padh, H. (2011). Implications of gene copy-number variation in health and diseases. *Journal of human genetics*, 57, pp. 6-13.
- Astarita, G. e Langridge, J. (2013). An Emerging Role for Metabolomics in Nutrition Science. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics*, 6, pp. 179-198.
- Auclair, G. e Weber, M. (2012). Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. *Biochimie*, 94, pp. 2202-2211.
- Bach-Faig, A., *et al.* (2011). Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public health nutrition*, 14, pp. 2274-2284.
- Bannister, A. J. e Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 21, pp. 381-395.
- Bhatt, S. N. e Sharma, A. D. (2011). Nutrigenomics: a non - conventional therapy. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 8, pp. 100-105.
- Brown-Esters, O., Mc Namara, P. e Savaiano, D. (2012). Dietary and biological factors influencing lactose intolerance. *International Dairy Journal*, 22, pp. 98-103.
- Burdge, G. C. e Lillycrop, K. A. (2010). Nutrition, epigenetics, and developmental plasticity: implications for understanding human disease. *Annual review of nutrition*, 30, pp. 315-339.
- Cahill, L., El-Sohemy, A. e Moo-Young, M. (2011). Nutrigenomics: a possible road to personalized nutrition. *Comprehensive biotechnology*, 4, pp. 703-712.
- Cao, Y., *et al.* (2014). The association of idiopathic recurrent early pregnancy loss with polymorphisms in folic acid metabolism-related genes. *Genes & nutrition*, 9, pp. 1-8.
- Constantin, N. e Wahli, W. (2013). Nutrigenomic foods. *Nutrafoods*, 12, pp. 3-12.
- Cormier, H., *et al.* (2014). Nutrigenomics-perspectives from registered dietitians: a report from the Quebec-wide e-consultation on nutrigenomics among registered dietitians. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 27, pp. 391-400.
- Crider, K. S., *et al.* (2012). Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folates role. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 3, pp. 21-38.

-
- Falchi, M., *et al.* (2014). Low copy number of the salivary amylase gene predisposes to obesity. *Nature genetics*, 46, pp. 492-497.
- Fard-Esfahani, P., *et al.* (2011). An increased risk of differentiated thyroid carcinoma in Iran with the 677C T homozygous polymorphism in the MTHFR Gene. *Cancer epidemiology*, 35, pp. 56-58.
- Feil, R. e Fraga, M. F. (2012). Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature Reviews Genetics*, 13, pp. 97-109.
- Ferguson, L. R. (2006). Nutrigenomics. *Molecular diagnosis & therapy*, 10, pp. 101-108.
- Ferguson, L. R., *et al.* (2007). Nutrigenomics and gut health. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 622, pp. 1-6.
- García-Cañas, V., *et al.* (2010). Advances in Nutrigenomics research: novel and future analytical approaches to investigate the biological activity of natural compounds and food functions. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51, pp. 290-304.
- Garg, R., Sharma, N. e Jain, S. K. (2014). Nutrigenomics and Nutrigenetics: Concepts and Applications in Nutrition Research and Practice. *Acta Medica*, 1, pp. 124.
- Ghosh, D. (2010). Personalised food: how personal is it? *Genes & nutrition*, 5, pp. 51-53.
- Girirajan, S., Campbell, C. D. e Eichler, E. E. (2011). Human copy number variation and complex genetic disease. *Annual review of genetics*, 45, pp. 203-226.
- Gonda, T. A., *et al.* (2012). Folic acid increases global DNA methylation and reduces inflammation to prevent Helicobacter-associated gastric cancer in mice. *Gastroenterology*, 142, pp. 824-833. e7.
- Greenwald, P. e Milner, J. (2006). The challenge of nutrition in cancer prevention. *In: Heber, D., et al. (Ed.). Nutritional oncology. 2ª Edição.* London. Academic Press, pp. 349-361
- Greer, E. L. e Shi, Y. (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Reviews Genetics*, 13, pp. 343-357.
- Guéant, J.-L., *et al.* (2013). Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24, pp. 279-289.
- Gueant, J. L., *et al.* (2013). Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol Metab*, 24, pp. 279-89.

-
- Hake, S., Xiao, A. e Allis, C. (2004). Linking the epigenetic "language" of covalent histone modifications to cancer. *British journal of cancer*, 90, pp. 761-769.
- Henikoff, S. e Shilatifard, A. (2011). Histone modification: cause or cog? *Trends in Genetics*, 27, pp. 389-396.
- Ho, V., Massey, T. E. e King, W. D. (2013). Effects of methionine synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on markers of one-carbon metabolism. *Genes & nutrition*, 8, pp. 571-580.
- Joh, R. I., *et al.* (2014). Regulation of histone methylation by noncoding RNAs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, pp.
- Joo, M. K., *et al.* (2014). The potential and advances in RNAi therapy: Chemical and structural modifications of siRNA molecules and use of biocompatible nanocarriers. *Journal of Controlled Release*, pp. 1-9.
- Kelsey, G. e Feil, R. (2013). New insights into establishment and maintenance of DNA methylation imprints in mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368, pp. 1-15.
- Kim, J., Samaranyake, M. e Pradhan, S. (2009). Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular and molecular life sciences*, 66, pp. 596-612.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128, pp. 693-705.
- Kussmann, M., Krause, L. e Siffert, W. (2010). Nutrigenomics: where are we with genetic and epigenetic markers for disposition and susceptibility? *Nutrition reviews*, 68, pp. S38-S47.
- Li, J., Ping, Y. e Zheng, L. (2014). Histone – Mediated transgenerational epigenetics. In: Tollefsbol, T. (Ed.). *Transgenerational epigenetics*, Elsevier, pp 87-103.
- Macdonald, J. R., *et al.* (2014). The database of genomic variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic acids research*, 42, pp. D986-D992.
- Masotti, A., *et al.* (2010). Microarray technology: a promising tool in nutrigenomics. *Critical reviews in food science and nutrition*, 50, pp. 693-698.
- Mcbrian, M. A., *et al.* (2013). Histone acetylation regulates intracellular pH. *Molecular cell*, 49, pp. 310-321.

-
- Monteiro, J. P., *et al.* (2014). Methylation potential associated with diet, genotype, protein, and metabolite levels in the Delta Obesity Vitamin Study. *Genes & nutrition*, 9, pp. 1-19.
- Nazki, F. H., Sameer, A. S. e Ganaie, B. A. (2013). Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene*, 533, pp. 11-20.
- Neeha, V. e Kinth, P. (2013). Nutrigenomics research: a review. *Journal of food science and technology*, 50, pp. 415-428.
- Neibergs, H. e Johnson, K. (2011). Alpharma Beef Cattle nutrition symposium: Nutrition and the genome. *Journal of animal science*, 90, pp. 2308-2316.
- Nicolas, F. (2010). Biologia Celular. In: Nicolas, F. (Ed.). *Introdução à genética veterinária*. 3ª edição. São Paulo, Artemed Edirora, pp. 99-100.
- Parlee, S. D. e Macdougald, O. A. (2014). Maternal nutrition and risk of obesity in offspring: The Trojan horse of developmental plasticity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842, pp. 495-506.
- Roseboom, T. J., *et al.* (2011). Hungry in the womb: what are the consequences? Lessons from the Dutch famine. *Maturitas*, 70, pp. 141-145.
- Ruemmele, F. e Garnier-Lengliné, H. (2012). Why are genetics important for nutrition? Lessons from epigenetic research. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 60, pp. 38-43.
- Salbaum, J. M. e Kappen, C. (2012). Genetic and epigenomic footprints of folate. *Progress in molecular biology and translational science*, 108, pp. 129.
- Sales, N., Pelegrini, P. e Goersch, M. (2014). Nutrigenomics: Definitions and Advances of This New Science. *Journal of nutrition and metabolism*, 2014, pp. 1-6.
- Scarino, M. L. (2008). A sideways glance. Do you remember your grandmother's food? How epigenetic changes transmit consequences of nutritional exposure from one generation to the next. *Genes & nutrition*, 3, pp. 1-3.
- Shelling, A. N. e Ferguson, L. R. (2007). Genetic variation in human disease and a new role for copy number variants. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 622, pp. 33-41.
- Stover, P. J. (2009). One-carbon metabolism - genome interactions in folate-associated pathologies. *The Journal of nutrition*, 139, pp. 2402-2405.
- Talaulikar, V. e Arulkumaran, S. (2013). Folic acid in pregnancy. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*, 21, pp. 147-148.

-
- Tammen, S. A., Friso, S. e Choi, S.-W. (2013). Epigenetics: the link between nature and nurture. *Molecular Aspects of Medicine*, 34, pp. 753-764.
- Thakur, S., *et al.* (2013). Reduced expression of folate transporters in kidney of a rat model of folate oversupplementation. *Genes & nutrition*, 9, pp. 1-12.
- Trujillo, E., Davis, C. e Milner, J. (2006). Nutrigenomics, proteomics, metabolomics, and the practice of dietetics. *Journal of the American dietetic association*, 106, pp. 403-413.
- Van Ommen, B. e Stierum, R. (2002). Nutrigenomics: exploiting systems biology in the nutrition and health arena. *Current opinion in biotechnology*, 13, pp. 517-521.
- Vergères, G. (2013). Nutrigenomics - Linking food to human metabolism. *Trends in Food Science & Technology*, 31, pp. 6-12.
- Vernia, P., *et al.* (2010). Diagnosis of lactose intolerance and the "nocebo" effect: the role of negative expectations. *Digestive and Liver Disease*, 42, pp. 616-619.
- Viegas, B., *et al.* (2007). RNA de interferência e RNomics. In: Arraiano, C. e Fialho, A. (Ed.). *O mundo do RNA, novos desafios e prespectivas futuras*. Lisboa, Lidel, pp. 243-263.
- Williams, C. M., *et al.* (2008). The challenges for molecular nutrition research 1: linking genotype to healthy nutrition. *Genes & nutrition*, 3, pp. 41-49.
- Xu, C.-F. e Wang, J. (2014). Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 1-12.
- Zeisel, S. H. (2009). Epigenetic mechanisms for nutrition determinants of later health outcomes. *The American journal of clinical nutrition*, 89, pp. 1488S-1493S.
- Zhou, Y., Zhang, C. e Liang, W. (2014). Development of RNAi technology for targeted therapy - A track of siRNA based agents to RNAi therapeutics. *Journal of Controlled Release*, pp. 1-12.