

Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
Franco Maria Lajolo

INTRODUÇÃO

Sabe-se que os hábitos alimentares inadequados e o sedentarismo estão relacionados ao aumento do risco do desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como as cardiovasculares, o diabetes melito tipo 2 (DM2), o câncer, entre outras, e que a adesão a determinados padrões alimentares reduz o risco de incidência dessas doenças.^{1,2} Estudos epidemiológicos revelam correlações positivas entre alimentação rica em frutas e hortaliças e aspectos benéficos à saúde. Essa relação tem sido atribuída ao fato de esses alimentos apresentarem, além dos nutrientes essenciais, compostos bioativos de alimentos (CBA) de natureza química diversa, os quais têm ações biológicas importantes, atuando por meio da modulação de eventos moleculares e vias de sinalização celular.³

Dentre os diversos CBA encontrados na natureza, destacam-se os polifenóis, que têm sido objeto de pesquisas em todo o mundo. Tais pesquisas evidenciam o seu potencial de redução do risco de DCNT em razão de seus efeitos múltiplos, como os anti-inflamatórios, antioxidantes, vasodilatadores, quimiopreventivos e neuroprotetores.³⁻⁶ Esses benefícios podem ser atribuídos tanto a mecanismos não específicos relacionados à capacidade antioxidante, que incluem a captura ou o sequestro de espécies reativas de oxigênio (ERO), quanto aos mecanismos específicos, que envolvem interações com proteínas celulares essenciais em determinadas vias metabólicas.³⁻⁵

Estudos *in vitro* evidenciam que os polifenóis apresentam a capacidade de modular a expressão gênica e a atividade de enzimas, de receptores nucleares e de fatores de transcrição, podendo influenciar vias de sinalização celular que regulam eventos complexos, como a resposta inflamatória.^{3,7} A ação anti-inflamatória de alguns poli-

fenóis é baseada em mecanismos importantes, os quais ilustram a abrangência de suas ações em relação à saúde.

A inflamação é um processo complexo que envolve diversas vias de sinalização celular, ativação/inibição de fatores de transcrição e aumento da expressão de proteínas com ação pró-inflamatória. Os polifenóis atuam em vários alvos moleculares envolvidos na cascata de sinalização da inflamação, o que resulta na modulação da expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) e a interleucina-1 (IL-1beta).⁷⁻⁹

O estudo de mecanismos complexos, envolvendo dezenas de alvos moleculares, foi beneficiado nos últimos anos pelo desenvolvimento e aplicação das tecnologias ômicas e pelo conceito de biologia de sistemas, que são aplicados à genômica nutricional.¹⁰⁻¹² A transcriptômica, a proteômica, a metabolômica e a bioinformática permitem analisar, em fluidos, tecidos ou órgãos, milhares de proteínas e metabólitos simultaneamente e, assim, descobrir alvos moleculares dos CBA e suas consequentes ações no metabolismo. Estudos metagenômicos aplicados ao microbioma intestinal, por exemplo, permitem descobrir a interação recíproca entre microbioma e polifenóis, inferir sobre a biotransformação e identificar os derivados desses compostos que realmente chegam às células, facilitando a compreensão dos mecanismos envolvidos e a instituição de intervenções nutricionais personalizadas.¹¹⁻¹³

Neste capítulo, serão discutidas as ações dos polifenóis, particularmente dos flavonoides, na expressão gênica em diferentes tecidos e condições, tendo como foco sua ação antioxidante e anti-inflamatória. Será também explorada sua ação em mecanismos epigenéticos e como esses mecanismos explicam a sua atuação na promoção da saúde.

ESTRUTURA QUÍMICA E INGESTÃO DE FLAVONOIDES

Os polifenóis são metabólitos secundários constituintes de plantas superiores, encontrados em enorme variedade de alimentos de origem vegetal, como frutas, hortaliças e cereais, além de estarem presentes em bebidas preparadas com matérias-primas vegetais, como café, chás e vinho.

Os polifenóis podem variar de moléculas simples a polímeros de alto peso molecular e podem ser agrupados de acordo com a estrutura química básica em diferentes grandes classes: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e taninos.³

Os flavonoides possuem estrutura básica de quinze carbonos no seu núcleo fundamental (C6-C3-C6), composto por dois anéis aromáticos (anel A e B) unidos por uma cadeia linear de três carbonos que podem formar um anel heterocíclico (anel C) (Figura 18.1). O anel A é formado a partir da condensação de três unidades de acetato, enquanto o anel B e os três carbonos do anel central constituem uma unidade fenilpropanoide a partir do *p*-cumaroil-CoA.¹⁴

Dependendo da oxidação do anel central C e da posição do anel B, os flavonoides são classificados em

diversas subclasses. As principais subclasses de flavonoides presentes na alimentação são os flavonóis, as flavonas, os flavanóis (ou flavan-3-óis), as antocianidinas, as flavanonas, as isoflavonas e as chalconas (Figura 18.1). Na maioria dos flavonoides, o anel B está ligado na posição 2 do anel C; contudo, em alguns casos, o anel B pode estar ligado na posição 3 do anel C, como ocorre com as isoflavonas. Os compostos individuais dentro de cada subclasse são diferenciados pelo número e posição de hidroxilas e metoxilas presentes nos dois anéis aromáticos.¹⁴

Dentre as classes de flavonoides, os flavonóis são os mais difundidos nas plantas. Os principais representantes na alimentação são a quercetina, o caenferol, a isoramnetina e a miricetina. Já as flavanonas são comuns em frutas cítricas e incluem a naringenina, presente na toranja, e a hesperidina, na laranja. As antocianidinas, em pH ácido, apresentam-se na forma protonada denominada *cátion flavilium* e conferem pigmentação a diversas frutas e hortaliças, como morango, mirtilo, amora-preta, cebola roxa e berinjela, entre outras. Os flavanóis podem ser encontrados livres como a (+)-catequina e (-)-epicatequina nas uvas, ou esterificados ao ácido gálico, como a (-)-epigallocatequina-3-O-galato,

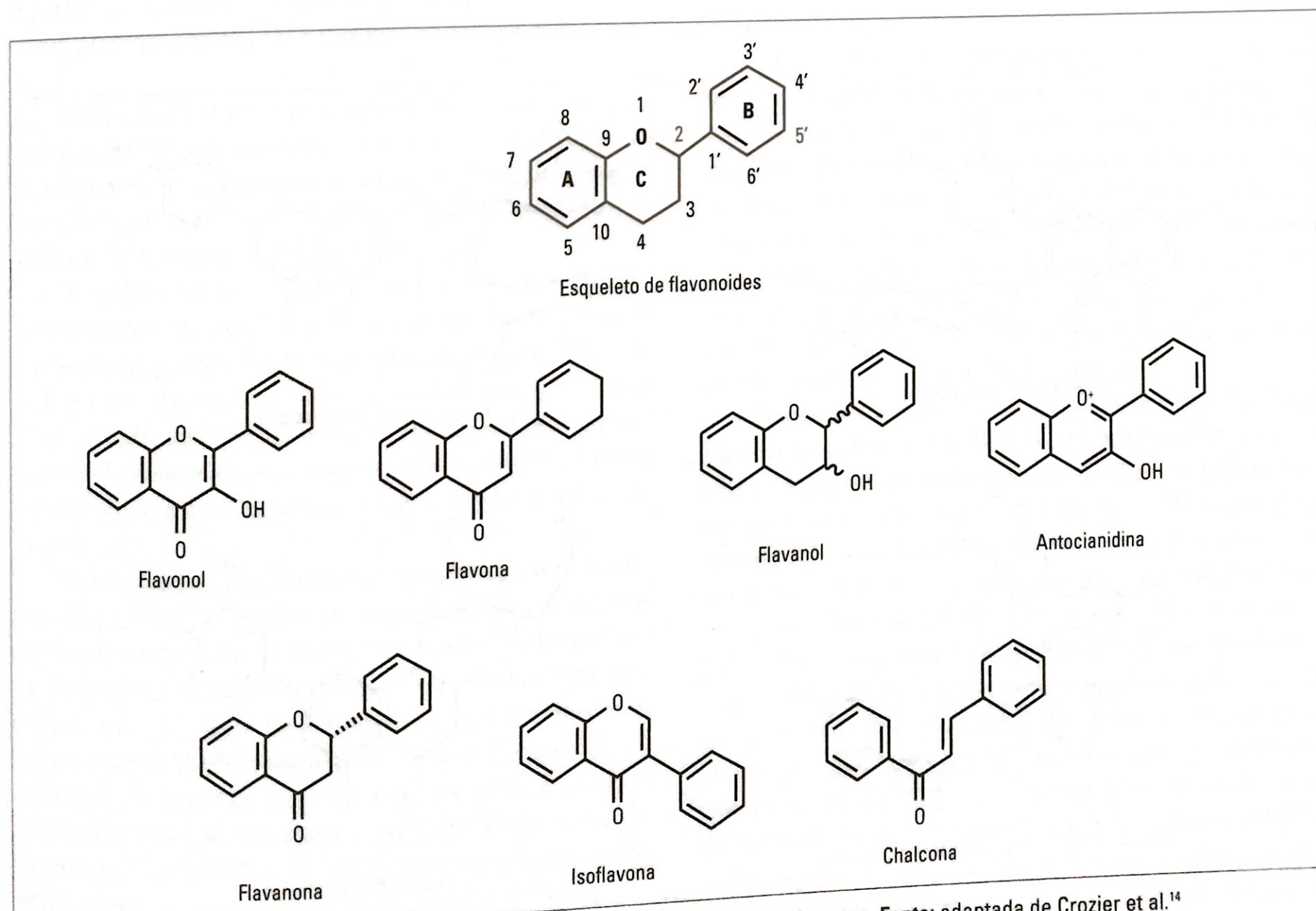


Figura 18.1 Estrutura básica de flavonoides e as principais classes encontradas em alimentos. Fonte: adaptada de Crozier et al.¹⁴

predominante nas folhas de *Camellia sinensis*, matéria-prima do chá-verde. As catequinas podem, ainda, formar estruturas complexas como as proantocianidinas oligoméricas e poliméricas, presentes no chocolate.¹⁵⁻¹⁷

Os flavonoides podem ocorrer como agliconas ou ligados a moléculas de carboidratos (forma glicosilada). Os flavonoides glicosilados mais comuns são os *O*-glicosídeos, nos quais um ou mais grupos hidroxila estão ligados a um ou mais açúcares por uma ligação hemiacetal, os quais algumas vezes estão ligados a grupos acila. Entretanto, podem ser encontrados como *C*-glicosídeos quando os açúcares estão ligados diretamente à estrutura (Figura 18.2). Frequentemente, os açúcares conjugados aos flavonoides são a *D*-glicose e a rutinose, mas outros açúcares também podem estar presentes, como a galactose, a xilose e a arabinose. A conjugação geralmente ocorre na posição 3 do anel C, podendo também ocorrer nas posições C-5, C-7, C-3, C-4' e C-5'.³

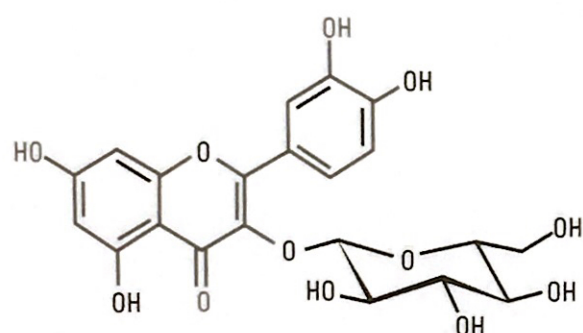
A estimativa de ingestão diária dos flavonoides é bastante variada, de acordo com as diferentes características regionais. No Reino Unido, a ingestão de flavonoides foi estimada entre 103 e 210 mg/dia, com contribuição principal dos flavanóis (58 a 64 mg/dia), das flavononas (22 a 89 mg/dia) e dos flavonóis (26 a 35 mg/dia). Já nos Estados Unidos, estima-se uma ingestão de

aproximadamente 1 g/dia, representada pela ingestão de flavononas, flavonóis, flavonas (160 a 175 mg/dia), antocianinas (180 a 215 mg/dia) e catequinas (220 mg/dia).¹⁸ No Brasil, estima-se a ingestão de 60 a 106 mg/dia de flavonoides, caracterizada principalmente pelas flavanonas.¹⁹

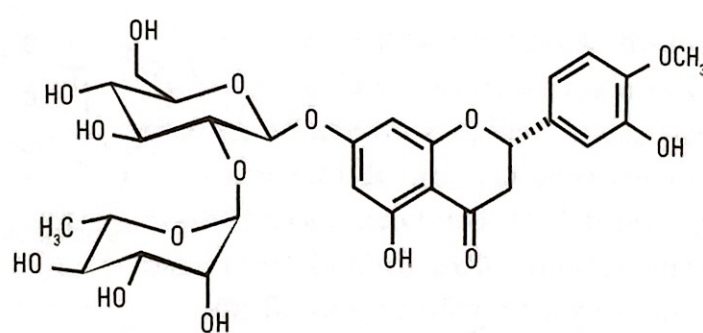
MODULAÇÃO DA CASCATA DE SINALIZAÇÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E DE DESTOXIFICAÇÃO

Estresse oxidativo e atividade antioxidante

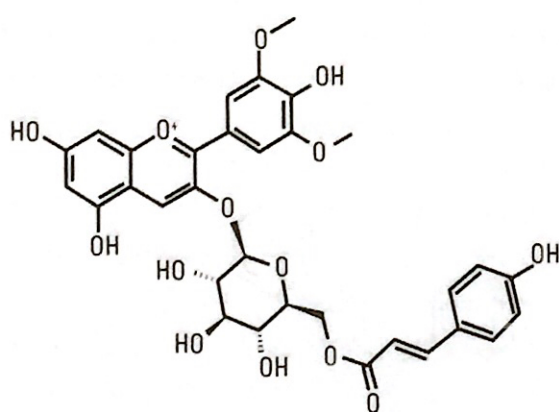
As ERO e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) atuam como importantes sinalizadores no controle da homeostase redox celular, exercendo função na defesa contra patógenos e modulando diversos processos biológicos, como a sinalização celular, a resposta inflamatória, a apoptose e a proliferação celular. Entretanto, quando ocorre o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes, há acúmulo de ERO e ERN, o que caracteriza o estresse oxidativo.²⁰ Tal situação resulta em danos a biomoléculas e em alteração na sinalização celular, contribuindo para o desenvolvimento de condições fisiopatológicas como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas.^{21, 22}



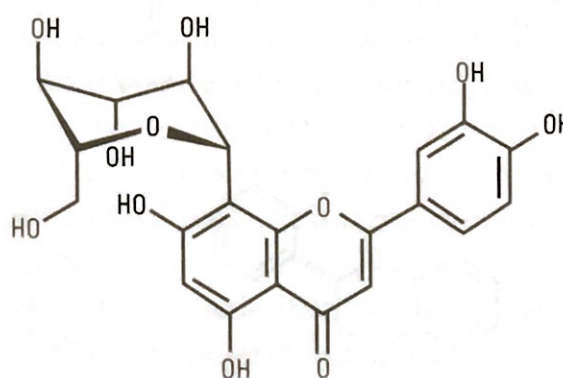
Quercetina-3-*O*-glucosídeo



Hesperetina-7-*O*-rutinosídeo



Malvidina-3-*O*-(6''-*O*-*p*-cumaroil)-glucosídeo



Luteolina-8-*C*-glucosídeo

Figura 18.2 Flavonoides *O*-glicosídeos e *C*-glicosídeos.

Nesse sentido, compostos com capacidade antioxidante podem exercer efeitos protetores contra DCNT. Entende-se por mecanismos antioxidantes de ação direta aqueles relacionados à ação de sequestro e/ou neutralização de ERO e ERN, exercidos pelos compostos antioxidantes endógenos e exógenos. Dentre os antioxidantes endógenos mais relevantes, pode-se citar:

- A glutathiona (GSH), um tripeptídeo formado pelos aminoácidos ácido glutâmico, cisteína e glicina, presente nas células em concentrações milimolares. A GSH é importante na manutenção da homeostase redox, neutralizando diversas ERO, dentre as quais os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila (OH^{\cdot}), e as ERN, como óxido nítrico (NO^{\cdot}) e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$).

- A bilirrubina, produto final do catabolismo do heme. Sugere-se que diferentes formas circulantes da bilirrubina teriam a capacidade de remover ERO, inibindo a oxidação do colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (LDL).

- As proteínas de transporte, como transferrina, lactoferrina e albumina, as quais atuam como potentes quelantes de metais e de radicais livres.

- O urato, produto final do catabolismo das purinas a partir da ação da xantina oxidase, um potente antioxidante presente em células e fluidos biológicos.^{23, 24}

Além destes, o organismo pode ainda ter o auxílio dos antioxidantes exógenos, obtidos a partir da alimentação, com destaque para os antioxidantes lipofílicos (como alfa-tocoferol) e os hidrofílicos (como vitamina C), além de CBA, como os polifenóis.²³

Os polifenóis são conhecidos por serem potentes agentes antioxidantes,²⁵ sendo essa propriedade um dos mecanismos propostos de proteção contra o excesso de ERO e ERN. Assim, os polifenóis podem ter ação direta sobre os radicais livres, como o ânion superóxido, os radicais hidroxila, a alcoxila e a peroxila, neutralizando-os e diminuindo a ação deletéria destes sobre as macromoléculas.

Muitos alimentos de origem vegetal que contêm alto teor de polifenóis apresentam capacidade antioxidante elevada quando avaliada por métodos *in vitro*; entretanto, a significância biológica desses resultados ainda não é clara, uma vez que tais modelos experimentais não consideram a biodisponibilidade desses compostos. A avaliação de diversos estudos clínicos com humanos indica que, após a ingestão de polifenóis por meio de alimentos e de bebidas, ou na forma isolada, em dose única, ocorre aumento do potencial antioxidante plasmático entre 5 e 30%, em decorrência da absorção e presença desses CBA. Por outro lado, na maioria dos estudos

envolvendo a ingestão repetida de alimentos – geralmente uma porção/dia, durante uma a três semanas –, não se observou aumento da capacidade antioxidante plasmática.²⁵

Entretanto, a maior parte da defesa antioxidante do organismo é representada por um sistema de enzimas antioxidantes. Os polifenóis podem aumentar a proteção antioxidante de maneira indireta, modulando a expressão de enzimas antioxidantes e de detoxificação (de fase II), por meio da via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE (*Kelch-Like ECH-Associated Protein 1 - Nuclear factor [erythroid-derived 2]-like 2 - antioxidant response element*). Essa via é dependente do potencial redox da célula, o qual modula de maneira positiva a expressão de diversas enzimas de detoxificação, dentre as quais a NAD(P)H:quinona oxirredutase 1 (NQO1), a glutathiona S-transferase (GST), a gama-glutamato cisteína ligase (gama-GCLC e gama-GCLM) e a heme-oxigenase-1 (HO-1), as quais contribuem indiretamente para a redução das concentrações de potenciais oxidantes. Essa via de sinalização também se relaciona à expressão de enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutathiona peroxidase (GPx) e o sistema enzimático tiorredoxina, enzimas que atuam diretamente sobre os agentes oxidantes, neutralizando-os.^{24, 26}

A HO-1 é a enzima limitante do catabolismo do heme em monóxido de carbono, biliverdina e ferro, com grande produção de superóxidos e outras ERO nesse processo. As principais classes dessas proteínas são a hemoglobina, as oxidases (como NADPH oxidase não mitocondrial, ciclo-oxigenase, succinato desidrogenase e citocromo c oxidase), além das peroxidases. Já a NQO1 catalisa a redução da quinona para a hidroquinona, na presença de NADH ou NADPH, prevenindo a formação de radicais livres a partir da ubiquinona.²³

O sistema enzimático tiorredoxina é fundamental na defesa antioxidante. Ele reduz pontes dissulfeto de diversas proteínas e remove o peróxido de hidrogênio ou outros peróxidos por meio do NADPH como doador de elétrons. Esse sistema compreende as proteínas tiorredoxina, tiorredoxina redutase, peroxirredoxinas e sulfirredoxina.²³ A SOD catalisa a neutralização do radical superóxido com a formação de peróxido de hidrogênio, o qual pode subsequentemente ser neutralizado pela ação da CAT, da GPx ou de outro sistema antioxidante. A GPx faz parte do sistema antioxidante que compreende a GSH e as enzimas glutathiona redutase (GR) e glutathiona-S-transferase (GST) (Figura 18.3), todas reguladas pela via Keap1-Nrf2-ARE, com importante papel na redução de peróxido de hidrogênio e lipídios oxidados.²³

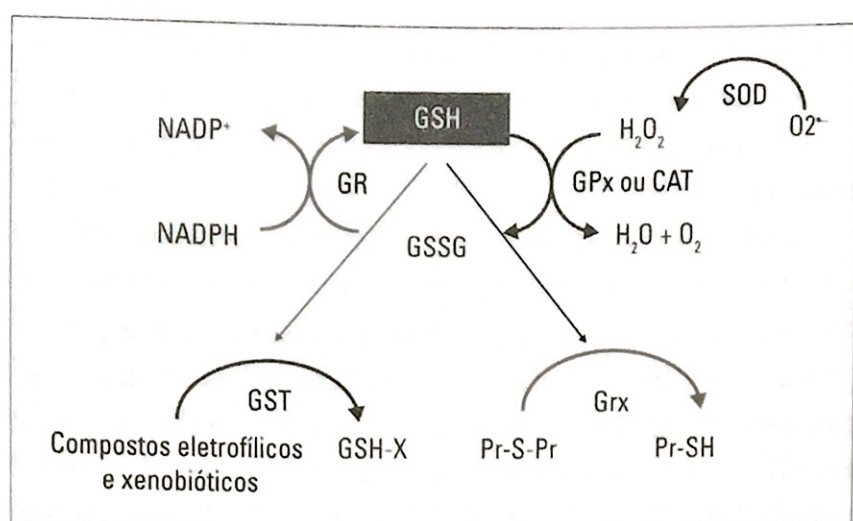


Figura 18.3 Mecanismo de ação do sistema glutatona. CAT: catalase; GPx: glutatona peroxidase; GR: glutatona redutase; Grx: glutarredoxina; GSH: glutatona reduzida; GSH-X: GSH ligada à xenobiótico; GST: glutatona-S-transferase; GSSG: glutatona oxidada; NADP: nicotina-mida adenina dinucleotídeo fosfato; NADPH: NADP reduzida; Pr-S-Pr: proteínas siladas por enxofre; Pr-SH: proteína tiol; SOD: superóxido dismutase. **Fonte:** adaptada de Zhang et al.²³

Via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE

A via Keap1-Nrf2-ARE é um sistema de sinalização integrado que regula a expressão de 1 a 10% dos genes humanos.²⁷ O Nrf2 (fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2) é um fator de transcrição que permanece no citoplasma em condições fisiológicas normais, na forma inativa, ligado a uma proteína denominada Keap1, a qual é sensível a alterações promovidas por ERO e compostos eletrofílicos. A Keap1 se liga fortemente ao Nrf2, ancorando-o no citoplasma próximo ao sistema proteassoma.^{21, 28}

Sob condições basais, duas proteínas Keap1 formam um homodímero que se liga ao Nrf2 por meio de dois sítios de reconhecimento (DLG e ETGE) com diferentes afinidades. A proteína Keap1 também está ligada à culina 3 (Cul3), a qual mantém associação com o Nrf2 e medeia sua poliubiquitinação. Na forma de complexo Nrf2-Keap1-Cul3, o Nrf2 é constantemente ubiquitinado pelo complexo Keap1-Cul3 ligase e degradado pelo sistema proteassoma 26S ($t_{1/2} < 20$ min). Sob condições de estresse oxidativo, a Keap1 sofre oxidação ou modificação covalente dos resíduos de cisteína, formando ligações dissulfeto intramoleculares,²¹ o que acarreta alteração conformacional do complexo. Essa desnaturação dissocia a interação com o sítio de reconhecimento DLG do Nrf2, afetando a ubiquitinação, uma vez que, sob essas condições, a conformação do Nrf2 não é adequada para ubiquitinação via Keap1-Cul3 ligase, aumentando assim o $t_{1/2}$ para > 200 minutos. Pode ocorrer a dissociação do complexo Keap1-Cul3 também pela modificação do resíduo de cisteína, a qual previne a ubiquitinação e a subsequente degradação proteassomal.²¹

Na presença de estímulos oxidantes ou de ERO, ocorrem modificações covalentes com consequente liberação

do Nrf2.²⁶ Uma vez ativado, o Nrf2 se transloca para o núcleo e se liga à proteína *small Maf* (sMaf), formando um heterodímero (Nrf2-sMaf). Esse complexo modula a expressão de diversos genes que codificam enzimas antioxidantes ao se ligar ao elemento de resposta antioxidante/elemento de resposta eletrofílica (ARE/EpRE).^{21, 28, 29}

A fosforilação do Nrf2 é outro mecanismo que regula a sua afinidade pela Keap1 e a posterior translocação para o núcleo, com consequente indução da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes e de detoxificação. Algumas quinases, como a proteína quinase C (PKC) e a fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K), promovem a dissociação do complexo Nrf2-Keap1-Cul3, provocando a sua translocação nuclear (Figura 18.4). Outras quinases, como as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) – dentre as quais as quinases reguladas por sinal extracelular (ERK), as quinases c-Jun amino-terminal (JNK) e a proteína p38 (p38) –, apresentam diferentes papéis na fosforilação do Nrf2, dependendo do tipo celular.^{23, 26} Outros mecanismos de ativação do complexo Nrf2-Keap1-Cul3 incluem a fosforilação da Keap1 e o estresse do retículo endoplasmático, resultando em fosforilação direta do Nrf2. Essas vias podem ocorrer concomitantemente ou em sequência, porém diferentes tecidos ou células podem apresentar mecanismos e vias de sinalização distintos.³⁰

O sistema de sinalização Keap1-Nrf2-ARE pode ser controlado por CBA em três níveis:

- Na ligação entre Nrf2-Keap1 e subsequente degradação proteica no citosol da Keap1.
- Na translocação do Nrf2 do citosol para o núcleo.
- Na interação do Nrf2 com os vários correguladores nucleares e na transativação dos genes que apresentam o ARE na porção regulatória.

Os CBA, incluindo os polifenóis, atuam predominantemente nos dois primeiros níveis.²⁶

Atuação de flavonoides na via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE

As catequinas pertencem à classe dos flavonoides e são normalmente encontradas como monômeros de catequina (Figura 18.5, D) e seu isômero, a epicatequina, comum no cacau e no vinho. Os monômeros podem, ainda, se apresentar esterificados ao ácido gálico, originando a epigalocatequina, a epicatequina galato e a epigalocatequina galato (EGCG) (Figura 18.5, E), esta última majoritariamente no chá-verde (*Camelia sinensis*). As catequinas são reconhecidamente potentes antioxidantes diretos que atuam na redução das concentrações de ERO

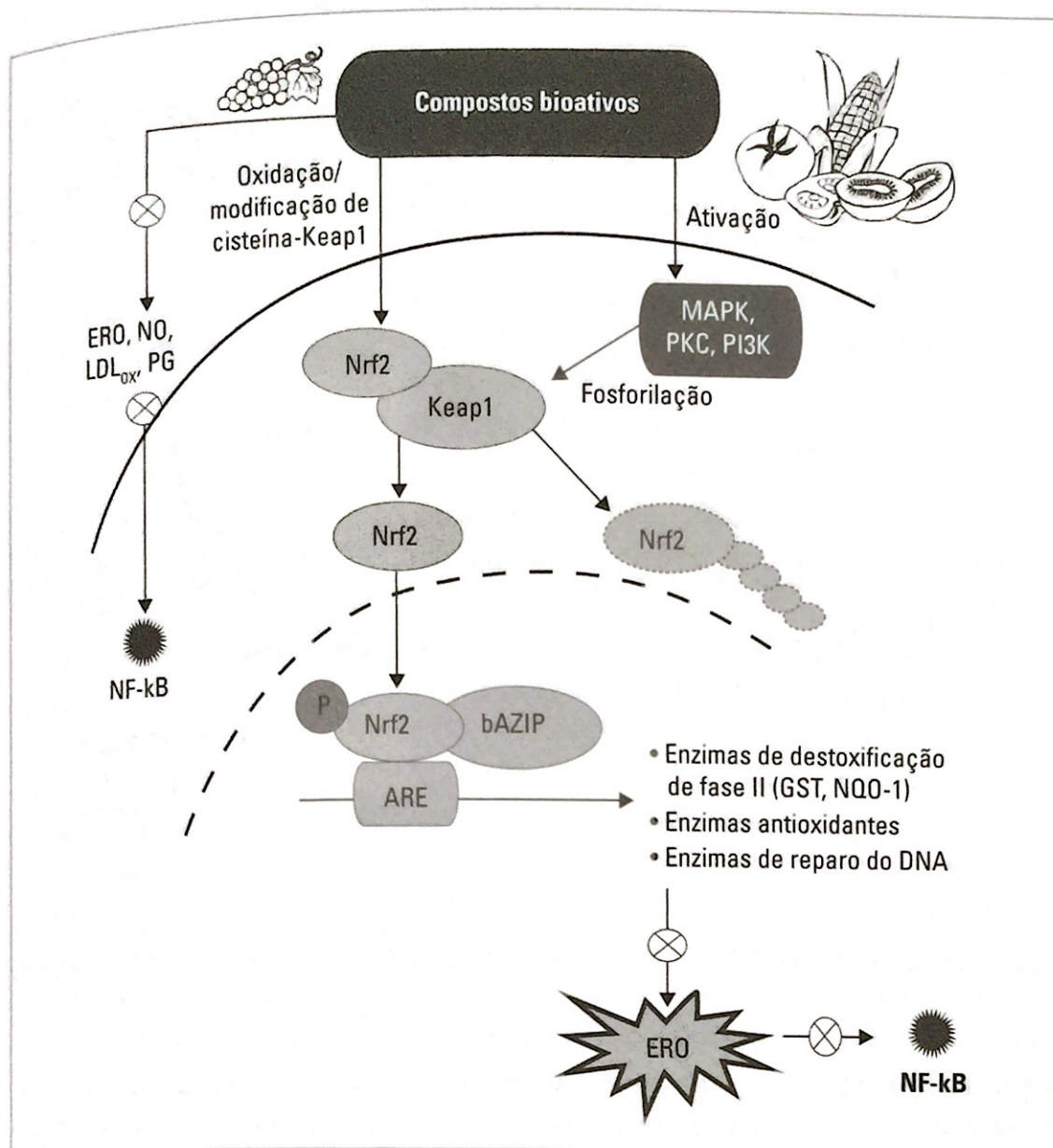


Figura 18.4 Ativação da transcrição de genes relacionados à defesa antioxidante, por meio da ligação do fator nuclear Nrf2 ao elemento de resposta antioxidante (ARE). bAZIP: *basic region-leucine zipper*; ERO: espécies reativas de oxigênio; GST: glutathione S-transferase; Keap1: *kelch-like ECH-associated protein 1*; LDL_{ox}: lipoproteína de baixa densidade oxidada; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; NF-kB: fator nuclear kappa B; Nrf2: *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*; NO: óxido nítrico; NQO-1: NAD(P)H:quinona oxireductase; PG: prostaglandinas; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase; PKC: proteína quinase C. **Fonte:** adaptada de Cardozo et al.³¹ e Tan et al.²⁶

e de ERN.¹⁴ Tanto extratos fenólicos de chá-verde quanto a EGCG isolada modulam as defesas antioxidantes por meio da ativação da via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE, tanto em modelo animal quanto em cultura de células.³¹

A EGCG pode regular a expressão de enzimas antioxidantes e de detoxificação por dois mecanismos relacionados à modulação da via Keap1-Nrf2-ARE. O primeiro e mais aceito envolve a forma oxidada da EGCG, a qual pode se conjugar a GSH, reduzindo sua concentração celular e acarretando alteração do estado redox celular. Esse estado de estresse oxidativo pode ativar as vias dependentes de quinases (como MAPK, Akt e p38), o que culmina na fosforilação dos resíduos de serina/treonina do Nrf2 e sua liberação do complexo Nrf2-Keap1-Cul3, possibilitando sua translocação para o núcleo. O segundo mecanismo envolve algumas formas reativas da EGCG, as quais podem promover a oxidação dos resíduos de cisteína da proteína Keap1, facilitando a dissociação do Nrf2 do complexo Nrf2-Keap1-Cul3.^{31,32}

Uma vez que a ação moduladora da EGCG sobre a via Keap1-Nrf2-ARE está relacionada à sua forma oxidada, esta pode apresentar efeito pró-oxidante e, portanto, ser deletéria. Tal efeito foi observado, por exemplo, em ratos suplementados com altas doses de EGCG (75 mg/

kg de peso corporal), em que ocorreu redução na expressão e na atividade das enzimas SOD, CAT e GPx. Por outro lado, em resposta a tal estímulo, observou-se aumento na expressão e na atividade de outras enzimas moduladas pela via Nrf2-ARE, entre elas a HO-1, a GST, a NQO-1, a GST e a tiorredoxina.^{33,34} Observou-se, ainda, a indução de HO-1 pela EGCG em células endoteliais. A dualidade da EGCG na resposta à ativação dos genes modulados pelo Nrf2-ARE aparentemente é dose dependente, ou seja, observou-se redução na expressão da HO-1 em altas concentrações (> 200 µM) e aumento em concentrações menores (< 50 µM),³⁵ denotando, desta forma, tanto atividade antioxidante como pró-oxidante.

Outros flavonoides também podem modular a via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE. A genisteína (Figura 18.5, B), conhecida como fitoestrógeno presente na soja, foi capaz de aumentar a expressão e a atividade hepática da NQO1, após administração crônica a ratos.³⁶ Contudo, em cultura de células pulmonares humanas, o extrato de chá-verde e o extrato de broto de brócolis somente induziram a expressão do RNAm das enzimas de fase II, a GST e a NQO1.³⁷

Além de modular a expressão de genes pela via do Keap1-Nrf2-ARE, alguns flavonoides também podem

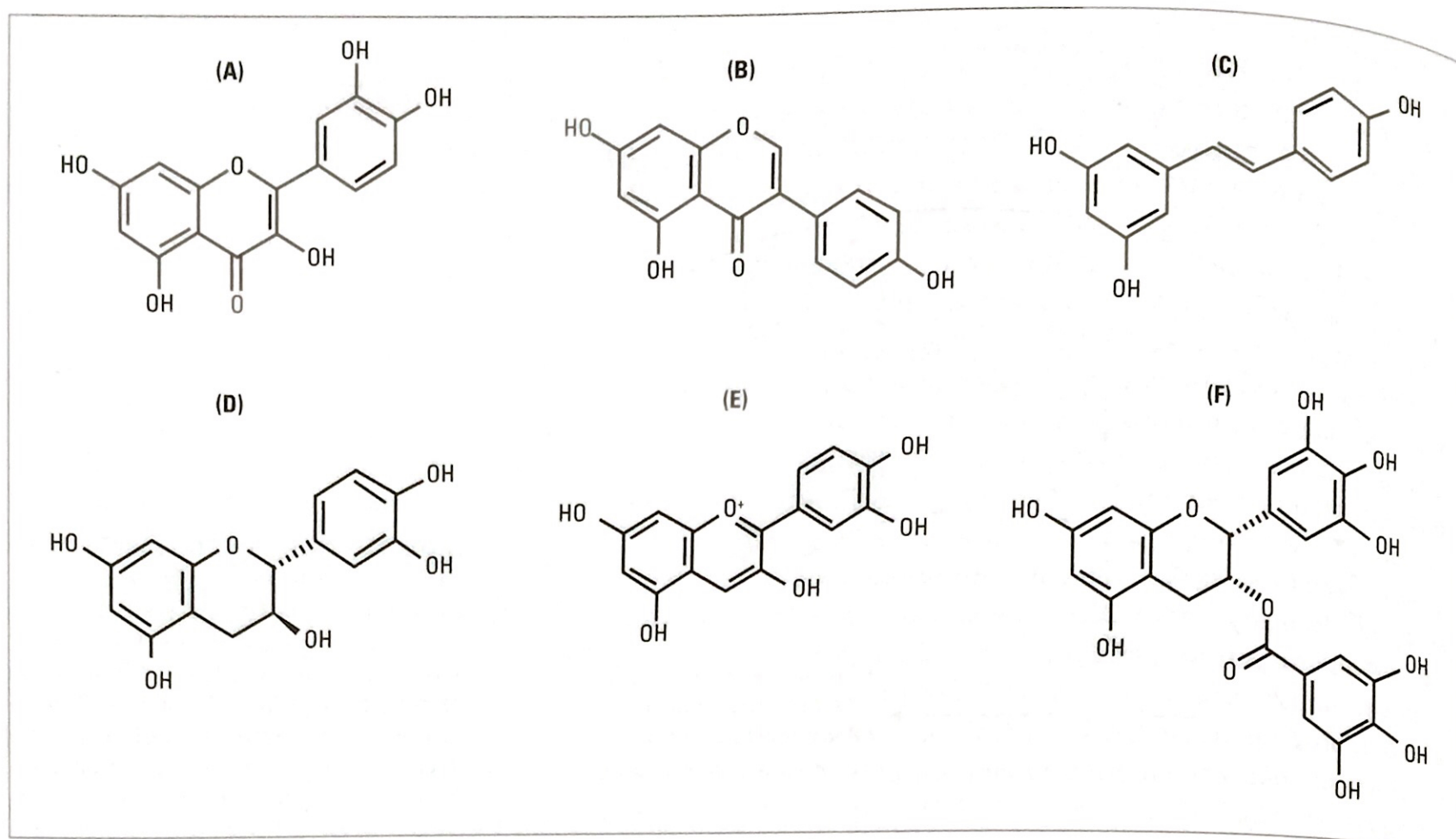


Figura 18.5 Compostos fenólicos com ação sobre a via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE. A: quercetina; B: genisteína; C: resveratrol; D: catequina; E: epigallocatequina galato; F: cianidina.

aumentar especificamente a expressão da proteína Nrf2. Em cultura de células de hepatoblastoma, a quercetina (Figura 18.2), um dos principais e mais abundantes flavonoides da alimentação, aumentou a expressão do RNAm e da proteína Nrf2, além de reduzir a concentração da proteína Keap1 em nível pós-traducional por meio da formação de uma proteína modificada, o que pode também ter contribuído para o aumento da transcrição da NQO1.³⁸ O mesmo foi observado para a EGCG em cultura de células e em modelo animal, nos quais concentrações < 25 mM se mostraram efetivas em modular as defesas antioxidantes por meio de aumento da expressão do Nrf2.³²

Extrato rico em antocianinas, polifenol pertencente à classe dos flavonoides, obtido de batata-doce roxa, apresentou efeito hepatoprotetor em ratos com fibrose hepática induzida pela dimetilnitrosamina. O extrato de antocianina, nas doses de 50, 100 e 200 mg de extrato/kg de peso corporal, administrado via gavagem, durante quatro semanas, foi capaz de aumentar a expressão das proteínas Nrf2, NQO1, HO-1 e GSH, as quais estavam reduzidas pelo tratamento com a dimetilnitrosamina.³⁹

O resveratrol (Figura 18.5, C), flavonoide presente em uvas e vinhos, normalizou a expressão renal de Nrf2 e aumentou a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GST e GR em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina. A dose administrada oralmente em suspensão aquosa foi de 5 mg de resveratrol/kg de peso corporal durante 30 dias.⁴⁰

Entre outros polifenóis capazes de induzir a expressão de genes regulados pelo Nrf2 estão o ácido cafeico fenetil éster, presente no mel; a curcumina, encontrada no açafrão-da-índia;⁴¹ e os ácidos fenólicos presentes no café. Além desses, outros compostos não polifenóis, como o sulforafano derivado de glicosinatos presentes no brócolis, o licopeno presente no tomate, a alicina do alho e a vitamina E de óleos vegetais, também são capazes de induzir a expressão dos genes regulados pelo Nrf2.³¹

MODULAÇÃO DA CASCATA DE SINALIZAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO: VIA DE SINALIZAÇÃO DO NF-KB

A inflamação é uma resposta do sistema imune inato a uma lesão ou infecção por patógenos. Entretanto, há evidências circunstanciais de que o estímulo recorrente ou uma deficiência na regulação dessa via podem acarretar inflamação crônica e sistêmica que, associada a outros fatores metabólicos, pode contribuir para o desenvolvimento e o agravamento de DCNT, dentre as quais as doenças cardiovasculares, o diabetes melito tipo 2 e o câncer.⁴² Assim, diversas linhas de pesquisa focam na sinalização molecular da inflamação e nos CBA que possam modulá-la.⁴²⁻⁴⁷

Uma das principais vias de sinalização envolvidas no processo inflamatório é a do fator nuclear kappa B (NF- κ B). Esse fator de transcrição modula a expressão de

diversos genes relacionados ao processo inflamatório, a proliferação e diferenciação celular, e a apoptose. O NF- κ B se encontra no citoplasma como um dímero (p50 e p65), na forma inativa, ligada ao seu inibidor I κ B (inibidor de kappa B), formando o complexo NF- κ B-I κ B. A ativação das diversas vias de sinalização promove a fosforilação do I κ B por quinases, o que desfaz o complexo, com posterior ubiquitinação e degradação proteossomal do inibidor. O NF- κ B é então translocado para o núcleo, onde modula a expressão de diversos genes que codificam enzimas e citocinas com ação pró-inflamatória.²² A geração de mediadores químicos liberados pelas células do sistema imune, como as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e o TNF-alfa; as quimiocinas e as ERO, em resposta à lesão do tecido; ou, ainda, a interação de lipopolissacarídeos (LPS) com receptores de membrana do tipo Toll 4 (TLR4) podem ativar várias vias de sinalização e amplificar a resposta ao estímulo inicial. Além desses estímulos, a via do NF- κ B também pode ser ativada por vias de sinalização moduladas pelo potencial redox da célula, dentre as quais a via MAPK.²²

Observou-se que o NF- κ B é constitutivamente ativado em diversos tumores e apresenta papel fundamental como modulador positivo da resposta pró-inflamatória, o que indica seu papel nos estádios de promoção e progressão do câncer.⁴⁸ A ativação do NF- κ B aumenta a expressão de genes antiapoptóticos, como *BCL2*, *BCL3*,

BCLXL, *CIAP1*, *CIAP2*, *XIAP*, *TRAF1*, *TRAF2*, *SOD2* e *A20*. Além disso, regula a expressão de genes envolvidos com os processos de invasão celular e angiogênese, dentre os quais aqueles que codificam moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e a E-selectina, além de enzimas e substâncias envolvidas no processo inflamatório, como ciclo-oxigenase 2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias.⁴⁹

Um dos genes regulados pelo NF- κ B é o da COX-2, enzima limitante no metabolismo do ácido araquidônico. Geralmente, a expressão da COX-2 não é detectada em tecidos normais, porém, esta é induzida por inflamação e hipóxia, e a sua atividade forma preferencialmente a prostaglandina E2 (PGE2).⁴⁸ Muitos CBA inibem a ativação do NF- κ B. O Quadro 18.1 apresenta diversos flavonoides e seus efeitos sobre os biomarcadores inflamatórios.⁴⁶

Diversos extratos de frutos denominados *berries* (frutas vermelhas) apresentam atividade anti-inflamatória, efeito atribuído às antocianinas. Entre as antocianinas mais comuns encontradas em *berries* e na maioria dos frutos e verduras estão a cianidina-3-O-glucosídeo e a peonidina-3-O-glucosídeo em *cranberries*; a peleronidina-3-O-glucosídeo no morango; e a cianidina-3-O-glucosídeo na amora-preta.¹⁴ O extrato rico em antocianinas de amora silvestre (*Morus nigra*), em modelo

Quadro 18.1 Alvos moleculares de flavonoides na inibição do processo inflamatório.

Flavonoides	Marcadores inflamatórios (alvos)	Fonte alimentar
<i>Flavonóis</i>		
Quercetina	↓ NF- κ B, ↓ AP-1	Cebola, maçã, rúcula
Caempferol	↓ PGE2, ↓ COX-2, ↓ NF- κ B	
Miricetina	↓ COX-2, ↓ NF- κ B	
Isoramnetina	↓ NF- κ B	
<i>Flavanonas</i>		
Naringenina	↓ iNOS, ↓ NO, ↓ NF- κ B	Cítricos
Hesperedina	↓ NF- κ B, ↓ p38, ↓ JNK	
Taxifolina	↓ ICAM-1	
<i>Antocianinas</i>		
Cianidina	↓ NF- κ B, ↓ PGE2, ↓ COX-2	Amora-preta Berinjela Uva, vinho
Delfinidina	↓ NF- κ B	
Malvidina	↓ IL-6	
<i>Isoflavonas</i>		
Genisteína	↓ NF- κ B, ↓ IL-8, ↓ ligação DNA-NF- κ B	Soja
Daidzeína	↓ NF- κ B, ↓ iNOS, ↓ NO	

AP-1: proteína ativadora 1; COX-2: ciclo-oxigenase 2; ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1; IL-6: interleucina 6; IL-8: interleucina 8; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; JNK: quinase c-jun amino-terminal; NF- κ B: fator nuclear kappa B; NO: óxido nítrico; p38: proteína quinase ativada por mitógeno p38; PGE2: prostaglandina E2. Fonte: adaptado de Prasad et al.⁴⁶

de peritonite induzido por LPS em camundongos, foi capaz de reduzir o influxo de leucócitos no local do estímulo, bem como a expressão da COX-2.⁵⁰ Outras *berries*, como morango, *cranberry* e mirtilo, em diferentes concentrações, tempo de administração, tipo de apresentação do alimento, quando administradas a indivíduos saudáveis ou com diferentes condições crônicas associadas à inflamação, também foram capazes de reduzir diversos biomarcadores inflamatórios. Dentre os biomarcadores modulados, destaca-se a expressão das enzimas iNOS, COX-2, IL-1b e IL-6, bem como das quimiocinas ICAM-1 e VCAM-1.⁴³ Os possíveis mecanismos que resultam na redução desses biomarcadores inflamatórios envolvem:

- Mecanismos antioxidantes diretos, os quais reduzem as ERO resultantes da resposta inflamatória.
- Modulação de vias de sinalização sensíveis ao estado redox da célula (via de sinalização MAPK).
- Modulação da via de sinalização do NF-kB e regulação negativa da expressão de genes pró-inflamatórios.^{43, 51, 52}

Flavanonas, como a hesperidina e a naringenina, características em frutas cítricas, também apresentam a propriedade de modular a expressão de diversos genes que codificam enzimas e citocinas pró-inflamatórias, em modelos animais e humanos, por meio da regulação das vias de sinalização do NF-kB e da MAPK.^{53, 54} Além disso, estudo clínico realizado com indivíduos saudáveis e dieta hiperlipídica revelou que a ingestão de suco de laranja como fonte de flavanonas, em dose única, reduziu a expressão de receptores de membrana do tipo *toll* 2 e 4 (TLR-2 e TLR-4),⁵⁵ importantes para a ativação da resposta inflamatória. Tais receptores são importantes, pois são ativados em resposta a componentes alimentares, assim como os LPS, capazes de induzir a cascata de sinalização do NF-kB.

Assim, alimentos de origem vegetal que apresentem compostos que possam inibir parcialmente a ativação do NF-kB podem ser potenciais candidatos à redução do risco de desenvolvimento de DCNT, possivelmente, por modular as respostas anti-inflamatória e antioxidante.

O Nfr2 tem sido relacionado à capacidade de antagonizar o fator de transcrição NF-kB de maneira indireta, uma vez que, ao atuar na diminuição do estresse oxidativo, reduz a ativação da via de sinalização do processo inflamatório.^{29, 56} Neste contexto, flavonoides e/ou outros CBA que possam modular o fator de transcrição Nfr2 também podem ter importante papel na citoproteção contra o processo inflamatório crônico.^{29, 56}

POLIFENÓIS E ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS

Ação de polifenóis na metilação do DNA e na modificação de histonas

A metilação do DNA é a modificação epigenética mais comum que envolve a ligação de grupos metil às citosinas nos nucleotídeos CpG. A abundância de grupos metil (hipermetilação) na região promotora de um gene promove o seu silenciamento ou inativação. Já a modificação de histonas, incluindo a metilação, a acetilação e, menos frequentemente, a fosforilação e a ubiquitinação de resíduos de aminoácidos, é outro mecanismo epigenético importante. Muitas modificações das histonas, assim como acontece com a metilação do DNA, são reversíveis e controladas por enzimas que adicionam ou removem radicais, alterando a conformação da cromatina, o acesso de fatores de transcrição às regiões promotoras de genes e, assim, a expressão destes.⁵⁷ Mais detalhes sobre mecanismos epigenéticos podem ser obtidos no Capítulo 5.

Existem muitas evidências de que a resposta do organismo à alimentação ocorre, em grande parte, por meio de mecanismos epigenéticos. Enquanto a metilação do DNA é geralmente associada à repressão da expressão gênica, as alterações em histonas podem promover tanto a ativação quanto a repressão, dependendo da modificação dos resíduos e dos aminoácidos envolvidos. Essas alterações envolvem a ação de histonas acetil transferases (HAT) e metil transferases (HMT), de histonas deacetilases (HDAC) e desmetilases (HDM). Normalmente, a acetilação do resíduo de lisina sete promove a abertura da cromatina, favorecendo a transcrição, enquanto a desacetilação desse resíduo tem o efeito contrário.

Alguns exemplos da ação de polifenóis, seus alvos moleculares e possíveis mecanismos epigenéticos estão descritos no Quadro 18.2.

Polifenóis e modulação da expressão de microRNA

Outro mecanismo que permite explicar como os nutrientes e CBA influenciam a manutenção da saúde envolve a modulação da expressão de microRNA (miR). Os miR são pequenas sequências de RNA, de 18 a 25 nucleotídeos, que não codificam proteínas. Participam do silenciamento pós-transcricional da expressão gênica, ligando-se por complementaridade à região 3'-UTR do RNAm, o que resulta na inibição da tradução ou na degradação do RNAm. Mais de 2 mil sequências de miR já foram descritas, e estima-se que esses pequenos RNAs possam regular até dois terços de todos os transcritos.⁵⁷

Quadro 18.2 Ação epigenética de polifenóis e possíveis mecanismos envolvidos (*)

Modificação	Composto	Alimento	Mecanismo epigenéticos
Metilação do DNA	Apigenina	Salsão	Inibição da metilação do DNA pela DNMT
	Antocianinas	Frutas vermelhas	
	Quercetina	Maçã	
	Ácido cafeico	Café	
	Resveratrol	Uva	
	Ácido elágico	Morango	
	Polifenóis do chá	Chá-verde	
Modificação de histonas	Genisteína	Soja	Ativa HAT. Inibe HDAC. Resulta na acetilação de várias histonas
	Quercetina	Frutas vermelhas	Inibe HAT. Ativa SIRT-1. Influencia a expressão de IP-10 e MIP-2
	Resveratrol	Uva	
	Polifenóis do chá	Chá	Ativa SIRT-1. Influencia a expressão de TNF-alfa, IL-8, RBP
	Resveratrol	Uva	
MicroRNA	Epigallocatequina 3-galato	Chá-verde	Inibe HAT. Reduz acetilação de histonas.
	Epigallocatequina 3-galato	Chá-verde	Aumenta miR-16 e modifica expressão de outros 60 miR
	Genisteína	Soja	Modula expressão de miR-27 e aumenta a de miR-146

DNMT: DNA metil transferase; HAT: histona acetil transferase; HDAC: histona desacetilase; IL-8: interleucina 8; IP-10: proteína 10 induzida por interferon gama; MIP-2: proteína inflamatória de macrófagos 2; RBP: proteína ligadora de RNA; SIRT-1: sirtuina-1; TNF-alfa: fator de necrose tumoral alfa. Fonte: adaptado de Barnett et al.⁵⁸

Revisão abrangente sobre o possível papel dos miR circulantes como marcadores da dieta, do estado nutricional e de doenças foi realizada por Ross e Davis.⁵⁷ Essa revisão discute as pesquisas sobre dieta e miR e o papel destes no câncer, nas doenças cardiovasculares, no diabetes e na adipogênese, bem como sugere direções para pesquisas. São destacados os efeitos de alimentos como chá, cacau, frutas e de CBA, como resveratrol, epigallocatequina, quercetina, curcumina e outros na modulação da expressão de diversos miR. Destaca-se que os miR participam do controle do desenvolvimento, da diferenciação e da proliferação celular, da inflamação e do metabolismo, em doenças como o câncer e no processo de senescência. Além disso, o padrão de expressão de miR circulantes (em fluidos corporais como sangue e saliva) emerge como biomarcador de doenças ou de suscetibilidade a doenças e de exposição à alimentação. A expressão de miR circulantes responde rapidamente a estímulos externos, modulando a expressão gênica, e talvez seja o mecanismo epigenético com maior potencial de ação na manutenção da saúde por meio da alimentação.⁵⁷

Um exemplo diz respeito à modulação da inflamação pela alimentação envolvendo o miR-155. MiR-155, miR-21, miR-181b e miR-34a são os mais investigados

em relação à inflamação e estão envolvidos na regulação dos TLR e da via de sinalização do NF-kB,⁵⁹ bem como na regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias. Sua menor expressão foi associada à redução da inflamação crônica, da hipertensão e de DCV. O efeito foi obtido pela ação de polifenóis de romã, como resveratrol e quercetina. Esses compostos reduziram a ação do miR-155, o que promoveu aumento da síntese do NO e redução do NF-kB e do TNF-alfa.^{57,60} Ainda, a suplementação de pacientes hipertensos e com DM2 durante 12 meses com extrato de uva resultou em redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias, entre elas a do TNF-alfa e da IL-1beta, além da redução na expressão do miR-155 e miR-34a, a qual foi associada à regulação do NF-kB e à sinalização de TLR.⁶¹

Outro polifenol, o resveratrol, presente em uvas e vinhos, atuou na redução da expressão de diversos miR característicos de células de câncer de cólon, como miR-21, miR-196a, miR-25, miR-17 e miR-92a-2.⁶² Da mesma forma, o resveratrol também reduziu o aumento da expressão do miR-155 oncogênico de maneira depende ao miR-663, o qual também foi regulado pelo resveratrol.⁶³

A ECGC, flavonoide encontrado no chá-verde, também modifica a expressão da família miR-let-7, que tem

como alvo molecular a proteína RAS. O efeito biológico resultante se observa no metabolismo da glicose e na sensibilidade à insulina.⁶⁰ Também demonstrou-se que EGCG, em cultura de carcinoma hepatocelular humano, atua aumentando a expressão do miR-16, que tem como alvos RNAm de proteínas que medeiam a apoptose via proteína Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*).⁶⁴

Contudo, a ação dos compostos bioativos sobre o miR parece controversa. Observou-se que a quercitina aumenta a expressão de miR-122, com efeito benéfico no metabolismo do colesterol; por outro lado, as proantocianidinas da uva reduziram a expressão desse miR, com efeito sobre o metabolismo hepático e aumento da síntese do colesterol.^{57, 60}

Assim, apesar de os mecanismos de ação dos compostos bioativos na modulação do perfil de expressão de miR e seu significado biológico ainda não estarem completamente esclarecidos, essa pode ser uma possível abordagem no controle do início e progressão de diversas doenças.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo inflamatório e o estresse oxidativo são evidenciados e relacionados ao início e à progressão de uma série de doenças de desenvolvimento crônico. Diversos CBA, principalmente os polifenóis, parecem modular de maneira positiva a via de sinalização do Nrf2, atenuando o estresse oxidativo e, de maneira negativa, a via de sinalização do NF-κB, reduzindo o processo inflamatório. Os mecanismos pelos quais os polifenóis atuam sobre esses dois processos não são completamente esclarecidos; contudo, sabe-se que os efeitos benéficos provenientes da ingestão contínua desses compostos, por meio da alimentação, advêm de um conjunto de ações relacionadas às diversas vias de sinalização e metabolismo, e não de um único mecanismo. Ainda, diferentes CBA podem atuar sobre um mesmo mecanismo e/ou em diferentes níveis.

Ademais, os estudos sobre a relação entre a ação de miR e alimentação/saúde/doença estão no início, sendo necessários mais ensaios controlados sobre as ações de miR circulantes e de outros marcadores. É preciso também considerar as interações entre os diversos compostos da alimentação e a sua transformação pela microbiota intestinal, o que pode resultar na produção e absorção de novas moléculas bioativas diferentes daquelas que existem nos alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean Diet. *N Engl J Med*. 2013;368:1279-90.

2. World Health Organization Global status report on communicable diseases (WHqlibdoc.who.int/publication/2011).

3. Del Rio D, Roriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013;18:1818-92.

4. Ellan S, Williamson G. Cocoa and human health. *Annu. Ver. Nutr.* 2013;33:105-28.

5. Alissa E, Ferns GA. Functional foods and nutraceuticals in the primary prevention of cardiovascular diseases. *J Nutr Metabol*. 2012;1-16.

6. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:243S-255S.

7. Pan MH, Lai CS, Ho CT. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Funct*. 2010;1:15-31.

8. Chuang CC, McIntosh MK. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity – mediated inflammation and metabolic diseases. *Annu Ver Nutr*. 2011;31:155-76.

9. Varamini B, Baur JA. Polyphenol resveratrol alters global patterns of gene regulation and improves physiology through multiple potential pathways. In: Bydlack WR, Rodriguez RL. *Nutritional genomics: the impact of dietary regulation of gene function on human disease*. Boca Raton: CRC Press; 2011.

10. Jones DP, Park Y, Ziegler TR. Nutritional metabolomics: progress in addressing complexity in diet and health. *Ann Rev Nutr*. 2012;32:182-202.

11. Manach C, Hubert J, Llorach R, Scalbert A. The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53:1303-15.

12. Ommen BV, Keijer J, Heil SG, Kaput J. Challenging homeostasis to define biomarkers for nutritio related health. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53:795-804.

13. Laparra HM, Sanz Y. Interaction of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research*. 2010;61:219-25.

14. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*. 2009;26:1001-43.

15. Ramiro-Puig E, Castell M. Cocoa: antioxidant and immunomodulator. *British Journal of Nutrition*. 2009;101:931-40.

16. Wang Y, Ho CT. Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. *J Agric Food Chem*. 2009;57:8109-14.

17. Lamuela-Raventós M, Romero-Pérez AI, Andrés-Lacueva C, Tornero A. Review: health effects of cocoa flavonoids. *Food Science and Technology International*. 2005;11:159-76.

18. Andersen OM, Markham KR. *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. New York: Taylor & Francis Group; 2006.

19. Arabbi PR, Genovese MI, Lajolo FM. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. *J Agric Food Chem*. 2004;52:1124-31.

20. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2007;35:1147-50.

21. Magesh S, Chen Y, Hu L. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Med Res Rev*. 2012;32:687-726.

22. Soobrattee MA, Bahorun T, Aruoma OI. Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer. *Biofactors*. 2006;27:19-35.

23. Zhang M, An C, Gao Y, Leak RK, Chen J, Zhang F. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Progress in Neurobiology*. 2013;100:30-47.