



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



LUIZ AUGUSTO DE MOURA

**Alterações epigenéticas em camundongos suplementados com óleo de
coco**

**Limeira
2021**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



LUIZ AUGUSTO DE MOURA

**Alterações epigenéticas em camundongos suplementados com óleo de
coco**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Souza Torsoni

Co-orientadora: M^a. Carolina Panzarin

**Limeira
2021**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

M865a Moura, Luiz Augusto de, 1998-
Alterações epigenéticas em camundongos suplementados com óleo de coco /
Luiz Augusto de Moura. – Limeira, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Adriana Souza Torsoni.

Coorientador: Carolina Panzarin.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Óleo de coco. 2. MicroRNAs. 3. Suplementação alimentar. I. Torsoni,
Adriana Souza, 1973-. II. Panzarin, Carolina, 1996-. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: Epigenetic changes in mice supplemented with coconut oil

Palavras-chave em inglês:

Coconut oil

MicroRNAs

Supplementary feeding

Titulação: Bacharel em Nutrição

Banca examinadora:

Alana Carolina Costa Veras

Data de entrega do trabalho definitivo: 07-12-2021

Autor: Luiz Augusto de Moura

Título: Alterações epigenéticas em camundongos suplementados com óleo de coco

Natureza: Trabalho de Conclusão de Curso em Nutrição

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas

Aprovado em: 07/12/2021.

BANCA EXAMINADORA

Adriana Torsoni

Prof^a. Dr^a. Adriana Souza Torsoni – Presidente
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Carolina Panzarin

M^a. Carolina Panzarin – Orientador(a)
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Alana C. Costa Veras

M^a. Alana Carolina Costa Veras – Avaliador
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Este exemplar corresponde à versão final da monografia aprovada.

Adriana Torsoni

Prof^a. Dr^a. Adriana Souza Torsoni
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, depois ao Laboratório de Distúrbios do Metabolismo (Labdime) por dar a oportunidade de fazer o estudo, a minha Orientadora Adriana Torsoni, e principalmente a minha co-orientadora Carolina Panzarin, que me ajudou em todos os processos do estudo.

RESUMO

Dietas ricas em calorias estão fortemente associadas com o aumento da prevalência de obesidade e relacionadas a um quadro de inflamação crônica, de baixo grau, determinado principalmente pelo consumo excessivo de ácidos graxos saturados de cadeia longa e muito longa. O acúmulo excessivo de gordura no organismo pode acarretar diversas comorbidades, dentre elas a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), que consiste no acúmulo de gordura no interior do hepatócito, na ausência do consumo de álcool. De maneira antagônica, diversos trabalhos têm relacionado o consumo do óleo de coco, e sua composição em ácidos graxos saturados de cadeia média, com a perda de peso e defendem seus benefícios à saúde através da combinação de maior gasto energético e saciedade. Recentemente têm-se observado que, muitas das alterações metabólicas decorrem de modificações na expressão gênica, determinadas por alterações epigenéticas como a expressão diferencial de microRNAs (miRNAs). Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes, que controlam a expressão de genes, através do bloqueio da tradução. Apesar das diversas informações sobre os benefícios do óleo de coco e seus componentes, há carência de informação sobre sua suplementação na dieta em estado de saúde e se o mesmo poderia exercer algum efeito sobre a modulação de miRNAs. Sendo assim, o presente estudo buscou investigar se a suplementação com óleo de coco pode interferir no metabolismo lipídico hepático, através da modulação da expressão gênica por miRNAs, como os *miR-122* e *miR-370*, em modelos animais. Para tanto, camundongos machos da linhagem Swiss, com 5 semanas de vida, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) foram mantidos em gaiolas individuais, com acesso à água e alimentação *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais foram divididos nos grupos: Controle (dieta controle e suplementação de 100µL de água por oral, com auxílio de micropipeta); CO100 (dieta controle e suplementação de 100 µL de óleo de coco extra virgem via oral, com auxílio de micropipeta); CO300 (dieta controle e suplementação de 300 uL de óleo de coco extra virgem via oral, com auxílio de micropipeta). Os resultados mostraram que o *miR-122* foi responsivo à suplementação dietética com óleo

de coco, tendo sua expressão aumentada em baixas doses, e uma expressão diminuída em altas doses. *Agpat*, alvo de *miR-122* não se apresentou alterado, da mesma forma que *miR-370* e seu alvo *Acadvl*. Assim, a suplementação com óleo de coco durante 8 semanas em camundongos não afetou o metabolismo lipídico hepático, indicando apenas o início de possível disfunção relacionada ao acúmulo ectópico de lipídios quando administrado em doses altas.

ABSTRACT

High-caloric diet are strongly associated with an increased prevalence of obesity and related to a chronic and low-grade inflammation, which can be mainly determined by the excessive consumption of long and very long chain saturated fatty acids. Excessive fat accumulation in the body can cause several comorbidities, including non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which consists in the accumulation of fat within the hepatocyte in the absence of alcohol consumption. In an antagonistic way, several research have related the consumption of coconut oil, and its composition in medium chain saturated fatty acids, with weight loss and defending its health benefits through the combination of increased energy expenditure and satiety. Recently, it has been observed that many of the metabolic alterations result from changes in gene expression, determined by epigenetic alterations such as the differential expression of microRNAs (miRNAs). miRNAs are small non-coding RNAs that control gene expression by blocking translation. Despite the diverse information about the benefits of coconut oil and its components, there is a lack of information about its supplementation in the diet in a healthy state and whether they could exert any effect on the modulation of miRNAs. Therefore, this study sought to investigate whether coconut oil supplementation can interfere with hepatic lipid metabolism, through the modulation of gene expression by miRNAs, such as miR-122 and miR-370, in animal model. Thus Swiss male mice, 5 weeks old, from the Center for Bioterism at UNICAMP (CEMIB) where maintained in an individual cage, with access to water and food ad libitum and a 12-hour light/dark cycle. The animals were divided into groups: Control (control diet and supplementation of 100 μ L of water orally, with the aid of a micropipette); CO100 (control diet and supplementation of 100 μ L of extra virgin coconut oil orally, with the aid of a micropipette); CO300 (control diet and supplementation of 300 μ L extra virgin coconut oil orally, with the aid of a micropipette). The results showed that miR-122 was responsive to coconut oil supplementation, with its expression increased at low doses, and its expression decreased at high doses. Agpat, target of miR-122 was not altered, as well as

miR-370 and its target Acadvl. Thus, supplementation with coconut oil for 8 weeks in mice didn't affect hepatic lipid metabolism, indicating only the beginning of a possible dysfunction related to ectopic lipid accumulation, when consumed in high doses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Expressão relativa do <i>miR-122</i> obtida nas amostras do fígado dos camundongos.....	18
Figura 2: Expressão relativa da <i>Acpat/Beta-actina</i> obtida nas amostras do fígado dos camundongos.....	19
Figura 3: Expressão relativa do <i>miR-370</i> obtida nas amostras do fígado dos camundongos.....	19
Figura 4: Expressão relativa da <i>Acadvl/Beta-actina</i> obtida nas amostras do fígado dos camundongos.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACADVL: Acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa

AGPAT: 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase

CPT1 α : Carnitina palmitoil transferase 1a

CO100: Grupo de animais suplementados com 100 μ l de óleo de coco

CO300: Grupo de animais suplementados com 300 μ l de óleo de coco

DHGNA: Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

HDL: Lipoproteína de alta densidade

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

miRNAs: MicroRNAs

TG: Triglicérides

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	METODOLOGIA.....	15
2.1.	Animais experimentais.....	15
2.2.	Análise da Expressão de miRNAs e mRNAs alvos por Real Time PCR Quantitativo.....	16
2.3.	Análise dos Resultados.....	17
3.	RESULTADOS.....	18
4.	DISCUSSÃO.....	21
5.	CONCLUSÃO.....	24
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

1. Introdução

A obesidade tornou-se um problema de saúde mundial, e sua prevalência atinge hoje cerca de 15,3% das mulheres e 11,1% dos homens (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Diversos fatores colaboram com sua etiologia, tais como herança genética, estilo de vida, alterações psicossociais e fatores ambientais. Dentre esses últimos, um dos mais relevantes é a dieta, tanto o número de calorias ingeridas quanto a sua fonte (DEOL, 2015). Um estudo recente estimou que até 2025 a prevalência global da obesidade atingirá 18% nos homens e ultrapassará 21% entre as mulheres (DI CESARI et al, 2016).

Diversas comorbidades estão associadas à obesidade, como resistência à insulina, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), dislipidemia e hipertensão, que são determinantes para o desenvolvimento da síndrome metabólica (SOLER, 2008). A síndrome metabólica é um distúrbio metabólico que está fortemente associado com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 (CHEN, 2007). A DHGNA está fortemente relacionada com a resistência à insulina e é conhecida como a manifestação hepática da Síndrome Metabólica (YOUNOSSI et al, 2016; KLEINER et al., 2005). A DHGNA, determinada pelo acúmulo de gordura no fígado na ausência do consumo de álcool, pode acarretar problemas mais graves de saúde como a fibrose, cirrose, câncer de fígado e insuficiência hepática (YOUNOSSI et al, 2016; CLARK, JEANNE, 2006).

Óleos e gorduras utilizados na dieta possuem papel importante na regulação do peso corporal, e sua importância na etiologia de doenças metabólicas tem gerado diversas discussões ao longo da história (BOATENG, 2016). Apesar de sua importância na formação de substratos essenciais (tais como esteróides, estrógenos, progesterona e testosterona), dietas ricas em lipídios estão fortemente associadas com o aumento da prevalência de sobrepesos e um aumento do risco de desenvolvimento de doença arterial

coronariana, hipertensão arterial, diabetes mellitus e certos tipos de câncer (BOATENG, 2016). Dietas com alta ingestão de gorduras saturadas e trans favorecem um estado pró-inflamatório que contribui para o desencadeamento da resistência à insulina, favorecendo o acúmulo de gordura no fígado (KENNEDY et al., 2009). Recentemente têm-se observado que, muitas das alterações metabólicas que ocorrem na obesidade são decorrentes de modificações na expressão gênica, determinadas por alterações epigenéticas (LV et al., 2019). As alterações epigenéticas são caracterizadas por modificações químicas no DNA, que não levam a modificações nas bases nitrogenadas, como a metilação do DNA, modificações de histonas e a expressão de miRNAs (LV et al., 2019). Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes, compostos de cerca de 16 a 20 nucleotídeos, responsáveis pelo controle da expressão de genes, em sua maior parte através do bloqueio da tradução, seja por indução da degradação do mRNA, seja por impedimento da associação do mRNA ao ribossomo (BARTEL, 2004; HU et al., 2014; KARNAT et al, 2015).

Alguns microRNAs (miRNAs) vêm sendo estudados devido sua importância no metabolismo energético e por sua modulação frente a alterações patológicas, dentre eles, destacam-se os miRNAs *miR-122* e *miR-370* (GAO et al., 2012). Estudos com humanos mostram que o aumento da expressão de *miR-122* e *miR-370* ocorre em pacientes com hiperlipidemia, estando associado à doença arterial coronariana (GAO et al., 2012). Historicamente, o *miR-122* é o primeiro miRNA identificado como sendo envolvido na regulação do metabolismo lipídico (HU et al., 2012). Esse miRNA é altamente expresso no fígado, e sua regulação negativa está envolvida na desregulação do metabolismo lipídico sistêmico e hepático (THAKRAL, 2015). O *miR-122* está relacionado com alguns mRNAs, dentre seus alvos está a α 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase (*AGPAT1*) (TAKEUCHI, REUE, 2009). A *Agpat1* possui ação na biossíntese de triglicérides (TG), catalisando a conversão de ácido lisofosfatídico em ácido fosfatídico e fosfolipídio (TAKEUCHI, REUE, 2009). O aumento da expressão da *miR-122* também está

relacionado com a regulação negativa da CUTL1, assim contribuindo para a diferenciação dos hepatócitos (HU et al., 2012). O *miR-122* foi relacionado diretamente com o acúmulo de colesterol e ácido graxo, e estudos feitos com roedores mostraram que a diminuição da expressão da *miR-122* resulta na diminuição dos níveis de colesterol LDL e HDL, tanto no sangue quanto no fígado, além de diminuir o acúmulo de gordura no fígado (HU et al., 2012).

Simino e colaboradores (2017) observaram que o tratamento de hepatócitos com palmitato, um ácido graxo saturado, levou à diminuição de *miR-122* e aumento de *miR-370*, além do acúmulo de gordura nestas células. Diversos estudos também têm relacionado a expressão de *miR-370* com o desenvolvimento de DHGNA. Benatti e colaboradores (2014) identificaram um aumento na expressão de *miR-370* hepático na prole de mães com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. O *miR-370* parece controlar o metabolismo lipídico através da inibição de CPT1 α e da acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa (*ACADVL*), que estão relacionados no controle da oxidação de ácidos graxos (ILIOPOULOS et al, 2010; SIMINO et al, 2017). A *Acadvl* possui papel importante no metabolismo corporal, já que catalisa a primeira etapa da via de β -oxidação, formando uma ligação dupla trans C2-C3 no ácido graxo de cadeia muito longa (ZHANG, 2015). O *miR-370* tem sido estudado também por sua interação com *miR-122*, uma vez que foi observado possível região de ligação entre eles e a modulação inversa destes miRNAs no fígado de prole de mães obesas com DHGNA (BENATTI et al, 2014; ILIOPOULOS, et al., 2010; SIMINO et al, 2017).

Com o intuito de perda de peso e controle da obesidade, houve uma grande oferta de dietas nos últimos anos que prometem efeitos eficientes em curto prazo, e mesmo elas carecendo de fundamentos científicos, estabeleceram práticas alimentares populares e temporárias que promovem resultados atraentes à população (BETONI, 2010). As dietas da moda são muito procuradas pela imprensa popular e podem trazer consequências prejudiciais ao organismo humano (BETONI, 2010). Um produto que ganhou popularidade considerável nos últimos anos foi o óleo de coco que, em geral, é

utilizado em frituras, panificações e até mesmo no café (CLEGG, 2017). Muitos artigos relacionam o óleo de coco com a perda de peso e defendem seus benefícios à saúde através da combinação de maior gasto energético e saciedade induzida pelos ácidos graxos de cadeia média (CLEGG, 2017).

A obtenção do óleo de coco é feita através do coqueiro da espécie *Cocos nucifera*. Seu processamento, tradicional da África Ocidental, ocorre através da trituração e pressionamento da copra (polpa seca do fruto) para se obter os óleos. Esse processamento também é feito por grandes indústrias e a venda do óleo de coco é livre no mercado (KORRAPATI et al., 2019). A composição de ácidos graxos do óleo de coco é: Ácido Caprílico, C-8:0, (8%); Ácido Cáprico, C-10:0, (7%); Ácido Láurico, C-12:0, (49%); Ácido Mirístico, C-14:0, (8%); Ácido Palmítico, C-16:0, (8%); Ácido Esteárico C-18:0 (2%); Ácido Oleico, C-18:1, (6%); Ácido Linoleico, C-18:2, (2%) (BOATENG, 2016). O ácido láurico, principal ácido graxo encontrado no óleo de coco, é considerado como ácido graxo de cadeia média, e o mesmo apresentou efeitos benéficos ao metabolismo em estudos realizados em animais, o que levou a mídia a atribuir grande relevância ao uso do óleo de coco em dietas (KORRAPATI et al., 2019). Entretanto, pesquisas recentes mostram que a suplementação com o óleo de coco em animais saudáveis pode ser prejudicial em relação às alterações metabólicas causadas (VERAS et al., 2021).

A suplementação de óleo de coco pelo período de 8 semanas, em animais saudáveis, levou ao aumento de peso, maior adiposidade, redução do gasto energético, aumento do nível sérico de colesterol e aumento de triglicerídeos, comparado ao grupo controle não suplementado (VERAS et al., 2021). Além disso, neste mesmo estudo, foi observado que o consumo de óleo de coco resultou em um comportamento ansioso em camundongos, identificado através dos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado (VERAS et al., 2021). A suplementação com óleo de coco também foi associada a um alto nível de inflamação e à disfunção mitocondrial no tecido hepático (VERAS et al., 2021). Entretanto, alguns estudos mostram que os ácidos graxos saturados presentes no óleo de coco podem desempenhar um

papel preventivo e também atuar como tratamento da síndrome metabólica (NAGAO, YANAGITA, 2010).

Outros estudos mostram que o óleo de coco é neutro à saúde em relação à concentração de lipídios no sangue após consumo, não causando aumento nos níveis de colesterol, nem sendo associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (CARANDANG, 2008). Seu consumo colabora com um aumento no HDL, diminuindo riscos de doenças cardíacas coronárias (CARANDANG, 2008). O óleo de coco também possui substâncias biologicamente ativas, como os tocofenóis, substâncias consideradas como antioxidantes e que possuem um papel relevante na prevenção de certas doenças crônicas, tais como as doenças cardíacas coronárias (CARANDANG, 2008). O óleo de coco, ou especificamente o ácido láurico presente no mesmo, tem papel fundamental como antibacteriano e antiviral, além de ser um suplemento eficiente para crianças e pacientes com problemas de absorção de nutrientes (FAMUREWA, 2018).

Diante disso, as informações sobre as ações do óleo de coco no metabolismo lipídico são controversas, pois há carência de informação sobre sua suplementação na dieta humana em estado de saúde (FAMUREWA, 2018). Além disso, não se sabe se os miRNAs hepáticos podem ser modulados pelo consumo de óleo de coco, desempenhando papel importante no controle do metabolismo lipídico. Dessa forma, o presente estudo buscou compreender, em modelo de experimentação animal, se a suplementação com óleo de coco, em concentrações equivalentes às prescritas e utilizadas por humanos, pode interferir no metabolismo lipídico hepático, através da modulação epigenética da expressão gênica do *miR-122* e *miR-370*.

2. METODOLOGIA

2.1. Animais Experimentais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss, com 5 semanas de vida, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). O manuseio dos animais foi realizado de acordo com o manual da

Universidade para o uso de animais experimentais em consonância com *Guide for the care and use of laboratory animals* publicado pelo National Institute of Health. Cada animal permaneceu em gaiola individual, com acesso à água e alimentação *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais foram divididos em 3 grupos, a saber: Controle (animais alimentados com ração Nuvilab® (Tabela 1), suplementados com 100 uL de água); CO100 (animais alimentados com ração Nuvilab® (Tabela 1) suplementados com 100 uL de óleo de coco extra virgem via oral, com auxílio de micropipeta); CO300 (animais alimentados com ração Nuvilab®, suplementados com 300 uL de óleo de coco extra virgem via oral, com auxílio de micropipeta).

Tabela 1: Composição nutricional da Dieta controle Nuvilab com base nas calorias totais.

Nuvilab® Controle	
Carboidratos	56,0%
Proteínas	19,0%
Lipídios	3,5%
Celulose	4,5%
Vitaminas e Minerais	5,0%

Os animais foram tratados por 8 semanas com as dietas experimentais e suplementados com o óleo diariamente até o final do período experimental.

2.2. Análise da Expressão de miRNAs e mRNAs alvos por Real Time PCR Quantitativo

Fragments de fígado dos animais controle e dos dois grupos experimentais foram coletados para avaliação da expressão de miRNAs e de seus respectivos mRNAs alvos. Os miRNAs e RNAs totais foram extraídos utilizando o reagente RNAzol (*Molecular Research Center, Inc.* - EUA), de acordo com as recomendações do fabricante e quantificados utilizando equipamento NanoDrop ND-2000. A transcrição reversa foi realizada com 3µg de RNA total, utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit ou

Taqman MiRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), para RNA e miRNA respectivamente. A expressão relativa foi determinada utilizando o sistema Taqman e os primers para os seguintes genes: *miR-122* e seu alvo *Agpat*, *miR-370* e seu alvo *Acadvl*. Como controle endógeno, foi utilizado *U6snRNA* para miRNA e *Rplp0* para os mRNAs. Cada PCR foi realizado a partir de 20ng de DNA complementar na plataforma ABI Prism 7500 Fast. Os dados foram expressos como valores relativos, determinados pelo método de comparação do *threshold cycle* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), de acordo com a recomendação do fabricante, usando o Sistema de Detecção de Sequência (Applied Biosystems versão 1.7).

2.3. Análise dos Resultados

Os resultados foram apresentados em média e erro padrão da média. Para a comparação de médias entre os grupos, foi utilizada análise de variância (ANOVA) e, quando necessário, teste de Dunnet para comparação múltipla de médias em relação ao grupo controle. Em todos os casos, o nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram analisados utilizando o programa "GraphPad Prism", versão 5 (GraphPad Software, Inc. USA).

3. RESULTADOS

Para identificar possíveis alterações no metabolismo lipídico mediado por miRNAs devido a suplementação de óleo de coco, as expressões de *miR-122* e *miR-370* foram analisadas e, junto a isso, foram analisados seus alvos *Atp5b1* e *Acat*, respectivamente.

A suplementação com óleo de coco resultou na diferença da expressão de *miR-122* em relação ao grupo controle. O grupo CO100 apresentou aumento da expressão hepática de *miR-122*, enquanto CO300 apresentou diminuição, comparados ao grupo controle (figura 1). *Atp5b1*, que é alvo de *miR-122*, teve sua expressão analisada para verificar a possível interação com o miR-122, e, tanto o grupo CO100 quanto o grupo CO300 não apresentaram alterações significativas da expressão da *Atp5b1* em comparação com o grupo controle (Figura 2).

Tanto o grupo CO100 quanto o CO300 não apresentaram alterações significativas da expressão hepática de *miR-370* em comparação com o grupo controle (Figura 3). A *Acat* também foi investigada para verificar sua interação com o *miR-370*. O grupo CO100 apresentou aumento na expressão de *Acat*, enquanto o grupo CO300 não apresentou diferença significativa na expressão de *Acat* em relação ao grupo Controle (Figura 4).

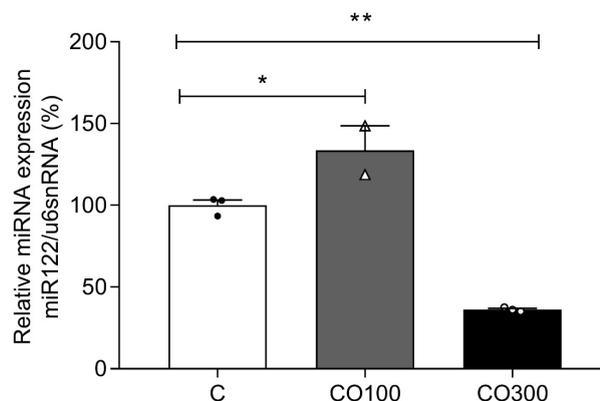


Figura 1: Expressão relativa de *miR-122* obtida por *PCR Real Time*. C: grupo controle; CO100: óleo de coco 100µL; CO300: óleo de coco 300µL (N=2-3). Barras representam a média +- erro padrão. *One way ANOVA* foi utilizado para comparar os três grupos, seguido de teste de

Dunnet para comparação múltipla de médias em relação ao grupo controle. “*” indica diferença estatística com valor de $p < 0,05$ “***” indica diferença estatística com valor de $p < 0,005$.

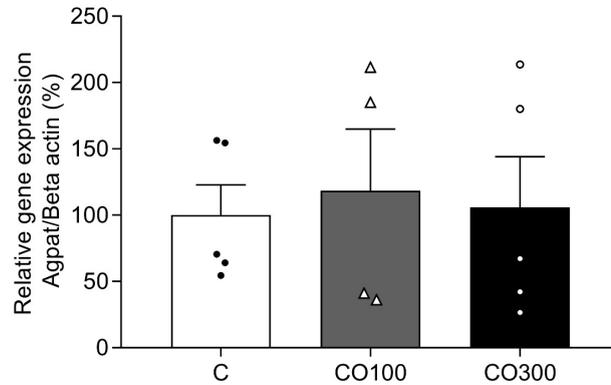


Figura 2: Expressão relativa de *Agpat* obtida por *PCR Real Time*. C: grupo controle; CO100: óleo de coco 100µL; CO300: óleo de coco 300µL (N=5). Barras representam a média +- erro padrão. *One way ANOVA* foi utilizado para comparar os três grupos, seguido de teste de Dunnet para comparação múltipla de médias em relação ao grupo controle.

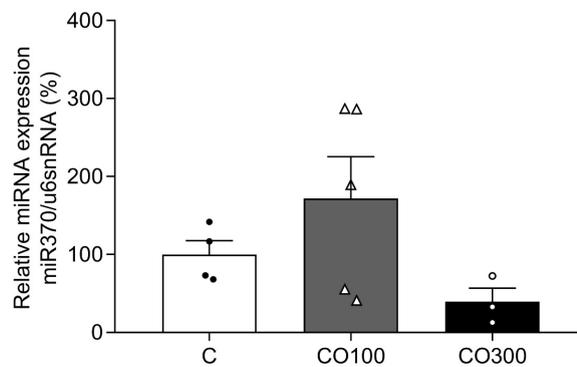


Figura 3: Expressão relativa de *miR-370* obtida por *PCR Real Time*. C: grupo controle; CO100: óleo de coco 100µL; CO300: óleo de coco 300µL (N=2-3). Barras representam a média +- erro padrão. *One way ANOVA* foi utilizado para comparar os três grupos, seguido de teste de Dunnet para comparação múltipla de médias em relação ao grupo controle.

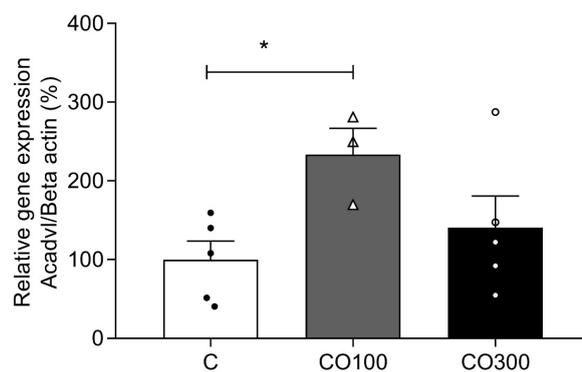


Figura 4: Expressão relativa de *Acadvl* obtida por *PCR Real Time*. C: grupo controle; CO100: óleo de coco 100µL; CO300: óleo de coco 300µL (N=2-3). Barras representam a média +- erro padrão. *One way ANOVA* foi utilizado para comparar os três grupos, seguido de teste de Dunnet para comparação múltipla de médias em relação ao grupo controle. “*” indica diferença estatística com valor de $p < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

Recentemente, a suplementação com óleo de coco em animais saudáveis foi associada ao aumento do ganho de peso corporal, maior adiposidade e redução do gasto energético em relação aos camundongos que não receberam a suplementação (VERAS et al., 2021). Porém, ainda não são conhecidos os efeitos da suplementação de óleo de coco sobre o metabolismo lipídico hepático. Devido à falta de trabalhos referente ao consumo de óleo de coco e seu efeito no metabolismo lipídico hepático, o objetivo deste estudo foi investigar se o consumo suplementar de óleo de coco na dieta poderia levar à modulação da expressão gênica de *miR-122* e *miR-370*, e seus alvos, *Agpat* e *Acadvl*, respectivamente, em camundongos submetidos à dieta controle.

Veras e colaboradores (2021) identificaram que camundongos submetidos à suplementação de óleo de coco por 8 semanas com baixa e alta dose (grupo 100 e 300 μ L), tiveram aumento do ganho de peso corporal, maior adiposidade e redução do gasto energético em relação ao grupo controle. Além disso, o nível sérico de colesterol, triglicerídeos, TNF- α também aumentou em relação ao grupo controle (VERAS et al., 2021). Esses dados indicam que um alto consumo de lipídios na dieta pode levar à obesidade e inflamação sistêmica de baixo grau, tendo riscos maiores de desenvolver doenças cardiovasculares e diabetes mellitus que estão altamente associados com a síndrome metabólica (VERAS et al., 2021; CHEN, 2007).

Alguns artigos relacionaram o consumo materno de dieta hiperlipídica com a modulação do metabolismo lipídico hepático da prole, causando alterações nas expressões de miRNAs, marcada pela diminuição da expressão de *miR-122* e aumento da expressão de *miR-370*. Conseqüentemente, foi observada a modulação da expressão de genes relacionados com o metabolismo lipídico, como o aumento da *Agpat* e a diminuição da *Acadvl*, alvos de *miR-122* e *miR-370*, respectivamente. O tratamento de hepatócitos com palmitato *in vitro* levou à diminuição de *miR-122* e aumento de *miR-370* e

o acúmulo de lipídeos no interior da célula (BENATTI, 2014; SIMINO et al., 2017; MANCINI et al., 2018).

Os dados obtidos no estudo atual demonstra que o grupo CO100 teve aumento da expressão de *miR-122*, podendo estar relacionado com a tentativa de estabelecer um mecanismo compensatório devido ao consumo do óleo de coco, enquanto que o grupo CO300 teve diminuição de *miR-122*, o que pode estar relacionado à predisposição para acúmulo de lipídeo no fígado, como observado em animais que consomem dieta hiperlipídica ou na prole de mães obesas, os quais desenvolvem DHGNA (BENATTI, 2014; SIMINO et al., 2017; BARCELOS, 2020). Em relação ao alvo de *miR-122*, não houve resultados significativos sobre a modulação de *Agpat*, embora estudos anteriores tenham demonstrado que a diminuição de *miR-122* resultou em aumento da expressão da *Agpat* (BENATTI, 2014; SIMINO et al., 2017; MANCINI et al., 2018).

miR-370 não apresentou alterações significativas em relação ao consumo suplementar de óleo de coco, o que pode indicar que talvez *miR-370* não seja responsivo a composição lipídica do óleo de coco, que possui majoritariamente ácido láurico. Tal resultado vai de encontro ao estudo feito em hepatócitos *in vitro*, tratados com ácido palmítico, onde foi observado aumento de *miR-370* (BOATENG, 2016; SIMINO, 2017). Em relação a *Acadvl*, apenas o grupo CO100 apresentou aumento de sua expressão em relação ao grupo controle, podendo indicar um aumento da β -oxidação com o intuito de reverter o acúmulo lipídico devido ao consumo do óleo de coco.

Panzarin e colaboradores (submetido à publicação) observaram que a diminuição de *miR-122* ocorreu logo após 3 dias de HFD, com uma tendência ao aumento no primeiro dia de dieta hiperlipídica. Assim, a alteração da expressão de *miR-122* pode aparecer de forma precoce ao desenvolvimento de DHGNA. Outros estudos também demonstram *miR-122* como potencial biomarcador sérico para a detecção precoce de DHGNA, uma vez que a sua diminuição no fígado está relacionada com o aumento deste na circulação (YAMADA, 2015; THAKRAL, 2015).

Entretanto, alguns estudos demonstram que o óleo de coco pode ser benéfico quando utilizado como tratamento através da suplementação de

baixas doses de óleo de coco. Em camundongos que foram submetidos à dieta com alto teor de carboidrato, e que tiveram piora nos parâmetros metabólicos, a suplementação com óleo de coco demonstrou ação positiva sobre o estresse oxidativo e o metabolismo lipídico no fígado, causando a diminuição sérica de colesterol e triglicérides totais, e também associado por agilizar o processo da reversão da esteatose hepática e resistência à insulina (NARAYANANKUTTY et al., 2018; ZICKER et al., 2019).

5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo apontam que a suplementação com óleo de coco em baixas doses não foi capaz de causar alterações moleculares que levam à modulação negativa do metabolismo lipídico hepático. No entanto, a suplementação em altas doses foi capaz de induzir redução da expressão de miR-122, podendo indicar o início de possível disfunção relacionada ao acúmulo ectópico de lipídios. Estudos sobre possíveis novos alvos de *miR-122*, alterado com a suplementação lipídica, é necessário para se investigar seus efeitos no metabolismo hepático, visto sua importância para a homeostase deste tecido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARCELOS, Samantha Thifani Alruz. **Doença hepática gordurosa não-alcoólica e risco cardiovascular: efeitos da suplementação com probióticos**. 2020. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/219426>> Acesso: 17 de novembro de 2021.

BARTEL, David P. **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function**. *cell*, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867404000455>> Acesso: 22 de abril de 2019

BENATTI, R. O. et al. **Maternal high-fat diet consumption modulates hepatic lipid metabolism and microRNA-122 (miR-122) and microRNA-370 (miR-370) expression in offspring**. *British journal of nutrition*, v. 111, n. 12, p. 2112-2122, 2014. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/maternal-highfat-diet-consumption-modulates-hepatic-lipid-metabolism-and-microrna-122-mir122-and-microrna370-mir370-expression-in-offspring/BE89CE2672671FCF48583A30F0609A84>> Acesso: 29 de setembro de 2021

BETONI, Fernanda; SKZYPEK ZANARDO, Polachini; CENI, Giovana Cristina. **Avaliação de utilização de dietas da moda por pacientes de um ambulatório de especialidades em nutrição e suas implicações no metabolismo**. *ConScientiae Saúde*, v. 9, n. 3, 2010. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/html/929/92915180013/>> Acesso: 10 de abril de 2019

BOATENG, Laurene et al. **Coconut oil and palm oil's role in nutrition, health and national development: a review**. *Ghana medical journal*, v. 50, n. 3, p. 189-196, 2016. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/gmj/article/view/145798>> Acesso: 10 de abril de 2019

CARANDANG, E. V. **Health benefits of virgin coconut oil**. *INDIAN COCONUT JOURNAL-COCHIN-*, v. 38, n. 9, p. 8, 2008. Disponível em: <<https://coconutboard.in/docs/English-Article-VCO-Carandang.pdf>> Acesso: 10 de abril de 2019

CHEN, Wei; BERENSON, Gerald S. **Síndrome metabólica: definição e prevalência em crianças**. 2007. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/jped/a/fCJy9dxjgqgj4VQLxX9S4jD/?lang=pt&format=pdf>
> Acesso: 11 de novembro de 2021.

Clark, Jeanne M. **The Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adults.** *Journal of Clinical Gastroenterology* 2006; Semin Liver Dis. 2008;28(4):339-350. Disponível em: <<https://oce.ovid.com/article/00004836-200603001-00003/HTML>> Acesso: 10 de abril de 2019.

CLEGG, Miriam E. **They say coconut oil can aid weight loss, but can it really?** *European journal of clinical nutrition*, v. 71, n. 10, p. 1139, 2017. Disponível em: <<https://coconutboard.in/docs/English-Article-VCO-Carandang.pdf>> Acesso: 10 de abril de 2010

DEOL, Poonamjot et al. **Soybean oil is more obesogenic and diabetogenic than coconut oil and fructose in mouse: potential role for the liver.** *PloS one*, v. 10, n. 7, p. e0132672, 2015. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0132672&type=printable>> Acesso: 10 de abril de 2019

Di Cesari, M. et al, **Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants.** *Lancet*, Volume 387, No. 10026, p1377–1396, 2 April 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014067361630054X>> Acesso: 10 de abril de 2019

FAMUREWA, Ademola C. et al. **Dietary supplementation with virgin coconut oil improves lipid profile and hepatic antioxidant status and has potential benefits on cardiovascular risk indices in normal rats.** *Journal of dietary supplements*, v. 15, n. 3, p. 330-342, 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19390211.2017.1346031>> Acesso: 10 de abril de 2019

GAO, Wei et al. **Plasma levels of lipometabolism-related miR-122 and miR-370 are increased in patients with hyperlipidemia and associated with coronary artery disease.** *Lipids in health and disease*, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2012. Disponível em: <<https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-11-55>> Acesso: 29 de setembro de 2021

HU, Jun et al. **MiR-122 in hepatic function and liver diseases.** *Protein & cell*, v. 3, n. 5, p. 364-371, 2012. DOI: 10.1007/s13238-012-2036-3. Disponível

em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22610888/>> Acesso: 29 de setembro de 2021

ILIOPOULOS, Dimitrios et al. **MicroRNA-370 controls the expression of MicroRNA-122 and Cpt1 α and affects lipid metabolism** [S]. Journal of lipid research, v. 51, n. 6, p. 1513-1523, 2010. Disponível em: <[https://www.jlr.org/article/S0022-2275\(20\)41026-0/fulltext](https://www.jlr.org/article/S0022-2275(20)41026-0/fulltext)> Acesso: 29 de setembro de 2021

Kennedy A, Martinez K, Chuang CC, LaPoint K, McIntosh M. **Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications**. J Nutr. 2009;139(1):1-4. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jn/article/139/1/1/4750865>> Acesso: 10 de abril de 2019

Kleiner, D. et al. **Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease**. Hepatology journal, 2005. Disponível em: <<https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.20701>> Acesso: 10 de abril de 2019

KORRAPATI, Damayanti et al. **Coconut oil consumption improves fat-free mass, plasma HDL-cholesterol and insulin sensitivity in healthy men with normal BMI compared to peanut oil**. Clinical Nutrition, v. 38, n. 6, p. 2889-2899, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261561418325949>> Acesso: 11 de novembro de 2021

LV, Juanxiu et al. **Antenatal hypoxia and programming of glucocorticoid receptor expression in the adult rat heart**. Frontiers in Physiology, v. 10, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6454194/>> Acesso: 22 de abril de 2019

MANCINI, Mariana Camargo Silva et al. **Caracterização metabólica e análise da expressão de miR-122 hepático na 2ª geração de mães alimentadas com dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação**. Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP, n. 26, 2018. Disponível em: <<https://econtents.bc.unicamp.br/eventos/index.php/pibic/article/view/983>> Acesso: 17 de novembro de 2021.

NAGAO, Koji; YANAGITA, Teruyoshi. **Medium-chain fatty acids: functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome**. Pharmacological research, v. 61, n. 3, p. 208-212, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S104366180900276X>> Acesso: 24 de novembro de 2021.

NARAYANANKUTTY, Arunaksharan et al. **Virgin coconut oil reverses hepatic steatosis by restoring redox homeostasis and lipid metabolism in male Wistar rats.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 98, n. 5, p. 1757-1764, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.8650>> Acesso: 16 de novembro de 2021.

PANZARIN et al. **Hepatic microRNA modulation might be an early event to Non-Alcoholic Fatty Liver Disease development driven by high-fat diet in male mice.** Submetido à publicação.

SIMINO, L. A. P. et al. **MicroRNA Let-7 targets AMPK and impairs hepatic lipid metabolism in offspring of maternal obese pregnancies. Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 8980, 26 dez. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-021-88518-8>> Acesso em: 12 de novembro de 2021.

SOLER, Gisele Lima Nogueira et al. **Doença hepática gordurosa não-alcoólica: associação com síndrome metabólica e fatores de risco cardiovascular. Rev Socerj**, v. 21, n. 2, p. 94-100, 2008.

TAKEUCHI, Kazuharu; REUE, Karen. **Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis.** American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, v. 296, n. 6, p. E1195-E1209, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19336658/>> Acesso: 24 de novembro de 2021.

THAKRAL, Sharda; GHOSHAL, Kalpana. **miR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir.** Current gene therapy, v. 15, n. 2, p. 142-150, 2015. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cgt/2015/00000015/00000002/art00005>> Acesso: 22 de novembro de 2021.

VERAS, Alana Carolina Costa et al. **Low-Dose Coconut Oil Supplementation Induces Hypothalamic Inflammation, Behavioral Dysfunction, and Metabolic Damage in Healthy Mice.** Molecular Nutrition & Food Research, v. 65, n. 10, p. 2000943, 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mnfr.202000943>> Acesso: 18 de outubro de 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **World health statistics 2019: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals.** World

Health Organization, 2019. Disponível em
<<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/324835/9789241565707-eng.pdf>> Acesso: 17 de novembro de 2021.

YAMADA, Hiroya et al. **Longitudinal study of circulating miR-122 in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease.** Clinica Chimica Acta, v. 446, p. 267-271, 2015. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009898115002399>>
Acesso: 22 de novembro de 2021.

YOUNOSSI, Zobair M. et al. **The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe.** Hepatology, v. 64, n. 5, p. 1577-1586, 2016. Disponível em:
<<https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.28785>> Acesso:
12 de novembro de 2021.

ZHANG, Sihuan et al. **Tetra-primer amplification refractory mutation system PCR (T-ARMS-PCR) rapidly identified a critical missense mutation (P236T) of bovine ACADVL gene affecting growth traits.** Gene, v. 559, n. 2, p. 184-188, 2015. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378111915000736>>
Acesso: 17 de novembro de 2021.

ZICKER, Marina Campos et al. **Virgin coconut oil is effective to treat metabolic and inflammatory dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice.** The Journal of nutritional biochemistry, v. 63, p. 117-128, 2019. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0955286318300986>>
Acesso: 16 de novembro de 2021.