UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA

Efeito de peptídeos do grão de amaranto (*Amaranthus cruentus* L.) sobre os mecanismos de absorção e síntese de colesterol

Amanda Caroline Cardoso Corrêa Carlos Menezes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas

São Paulo
2018

Efeito de peptídeos do grão de amaranto (*Amaranthus cruentus* L.) sobre os mecanismos de absorção e síntese de colesterol

Amanda Caroline Cardoso Corrêa Carlos Menezes

Versão corrigida

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas

São Paulo
2018

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dedicoà minha querida avó, *in memorian*.

AGRADECIMENTOS

A minha família, pelo apoio, auxílio e compreensão. Agradeço ao meu marido Tiago e filhos, Rafaela e Arthur pelo carinho e força. Aos meus pais e irmãos, pela ajuda e palavras de incentivo e descontração.

Ao professor José Alfredo Gomes Arêas pelos anos de ensinamento, paciência e orientação.

A banca examinadora, pelas sugestões dadas no momento da defesa: Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres, Daniel Carvalho Pimenta, Marilia Cerqueira Leite Seelaender e Marisa Passarelli. Ainda à professora Elizabeth Torres pela disponibilidade do Laboratório de Bromatologia e aos pesquisadores Daniel Pimenta e Valéria Nunes, pelo auxílio com análises e ao longo do trabalho.

As Doutoras Geni e Liania, pelo suporte técnico nos laboratórios, e pelas conversas do dia-a-dia.

As amigas e companheiras de laboratório Cíntia Silva, RosanaSoares e Bianka Caliman, pela amizade e cooperação técnica ao longo da jornada.

As minhas coordenadoras, anteriores e atual, do Hospital do Servidor Público Municipal: Fabiana Gonçalves Ferreira, Flávia Ivana Pallinger e, principalmente, a Eunice Harumi S. Sakamoto, que permitiram a execução da pesquisa.

As minhas amigas e colegas nutricionistas do HSPM, pela colaboração, apoio e risadas: Agnes Striulli, Luana Maron, Patrícia Pacheco, Bianca Bitencourt, Ana Matilde Rodrigues, Soraia Mauro, Samira Marques, Patrícia Pazzotti, Geise Domeneghetti, Elisete Kiik, Josie Miranda, Carlos Fernandes, Lilian Souza, Mônica Marques, Satiko Fukazawa e Ana Maria de Moraes. E secretárias, Mara, Tereza e Adelma pelo auxílio.

Aos amigos e colegas de laboratório: Camila Olivieri, Gustavo Fontanari, Marcelo Marques, Nara Letícia Zandonadi e Marcela Figueira, por todo o carinho, colaboração e aprendizado compartilhado.

E todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento do projeto.

CARLOS-MENEZES, A.C.C.C. **Efeito de peptídeos do grão de amaranto (*Amaranthus cruentus* L.) sobre os mecanismos de absorção e síntese de colesterol.** 2018. 103 f. Tese (Doutorado em Nutrição em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RESUMO

Introdução: Doenças cardiovasculares constituem importante causa de morte em todo mundo e a hipercolesterolemia está diretamente relacionada como fator agravante desta morbidade. A dieta desempenha papel importante neste processo e alguns alimentos como o amaranto, especialmente sua proteína, tem mostrado capacidade de redução do colesterol plasmático. Estudos sugerem que este efeito está relacionado a peptídeos formados durante a digestão da sua proteína, os quais desempenham um papel importante na regulação e modulação do metabolismo lipídico. Os efeitos hipocolesterolêmicos, já observados, indicam o uso da proteína do amaranto como um composto bioativo direcionado para a promoção da saúde. Considerando que os efeitos hipocolesterolêmicos destes peptídeos são complexos e há diversas hipóteses formuladas, torna-se importante a realização de estudos visando avaliar a interação dos peptídeos na absorção intestinal do colesterol e da sua modulação genética. **Objetivos**: Verificar os efeitos do hidrolisado da farinha do grão de amaranto na absorção de colesterol e modulação de genes ABCA1, ABCG1, NPC1L1, AMPK, HMGR e SREBP-2em células Caco-2, e modulação dos genes ABCG8, HMGR, SREBP-2 e AMPKem enterócitos de hamsters. **Metodologia:** O amaranto foi triturado, sua farinha desengordurada e sua proteína isolada, com posterior digestão *in vitro* e filtração dos peptídeos. Três experimentos *in vitro* foram conduzidos com as células: permeação de hidrolisado, permeação de colesterol e de efeito sob a expressão gênica. No primeiro, o hidrolisado proteico de amaranto foi permeado em culturas celulares de Caco-2 no tempo de 2 horas. O permeato foi coletado e analisado por LC/MS/MS. No segundo, o hidrolisado de amaranto foi incorporado a micelas de colesterol e incubados em culturas celulares, nas concentrações de 1,0 mg/ml, e 3,0 mg/ml em tempos de 2h. Também em concentrações de 3,0 mg/ml foi adicionado albumina e caseína para efeito comparativo. O conteúdo de colesterol na porção apical e basolateral foi analisado em HPLC. O terceiro experimento foi avaliaçãoda exposição do hidrolisado, em concentrações de 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml e 3,0 mg/ml, em tempos de 2h e 12h. Após este período, foi

realizada a extração de RNA total, avaliação de rendimento e integridade do material; medida quantitativa de expressão de RNAm por RT-PCR e quantificação relativa da expressão por ΔCT dos genes ABCA1, ABCG1, ABCG8, NPC1L1, AMP1, HMGR e SREBP-2das células Caco-2 e tecido intestinal de hamsters, coletados em ensaios anteriores. **Resultados:** Na permeação de colesterol não houve diferença entre as concentrações dos hidrolisados proteicos e controle, porém o hidrolisado de amaranto em 1,0 mg/ml demonstrou uma tendência em diminuir a absorção de colesterol ($p = 0,05$). Na exposição das células Caco-2 aos peptídeos por 2h, houve uma diminuição nas concentrações de RNAm dos genes ABCA1, NPC1L1, AMPK, HMGR e SREBP-2 nas concentrações de 3,0 mg/ml. O tempo de exposição de 12h apresentou resultados semelhantes ao tempo de 2h. Somente a expressão gênica de ABCG8foi influenciada pelo isolado proteico de amaranto no experimento *in vivo*. **Conclusão**: A partir do exposto, podemos concluir que os peptídeos do grão de amaranto influenciam o metabolismo de colesterol por mecanismos genéticos. Portanto, torna-se uma alternativa a ser introduzida na dieta de indivíduos saudáveis e em pacientes com hipercolesterolemia, visando a prevenção de agravos e como estratégia de terapia adicional no controle dos níveis de LDL-c plasmático. Contudo, mais experimentos *in vivo* e em humanos são necessários para estabelecer a dose efetiva para consumo.

Palvras-chaves: hipercolesterolemia, amaranto, peptídeos, transportadores de colesterol.

CARLOS-MENEZES, A.C.C.C. **Effect of amaranth grain peptides (*Amaranthus cruentus* L.) on the mechanisms of absorption and synthesis of cholesterol**. 2018. 103 p. Thesis (Doctorate in Nutrition in Public Health) - School of Public Health, University of Sao Paulo, Sao Paulo.

ABSTRACT

Introduction: Cardiovascular diseases are an important cause of death worldwide and hypercholesterolemia is directly related as an aggravating factor of this morbidity. Diet plays an important role in this process and some foods such as amaranth, especially its protein, have shown ability to lower plasma cholesterol. Studies suggest that this effect is related to peptides formed during the digestion of their protein, which play an important role in the regulation and modulation of lipid metabolism. The hypocholesterolemic effects, already observed, indicate the use of amaranth protein as a bioactive compound aimed to promoting health. Considering that the hypocholesterolemic effects of these peptides are complex and there are several hypotheses formulated, it is important to carry out studies to evaluate the interaction of peptides in the intestinal absorption of cholesterol and its genetic modulation. Objectives: To verify the effects of amaranth grain flour hydrolyzate on cholesterol uptake and ABCA1, ABCG1, NPC1L1, AMPK, HMGR and SREBP-2 genes modulation in Caco-2 intestinal cells, and modulation of ABCG8, HMGR, SREBP-2 genes and AMPK in hamster intestinal cells. Methodology: Amaranth was crushed, the created flour was defatted and its protein isolated, with subsequent in vitro digestion and filtration of the peptides. Three in vitro experiments were conducted with the cells: hydrolyzate permeation, cholesterol permeation and genetic expression. In the first, the amaranth protein hydrolyzate was permeated in Caco-2 cell cultures in the time of 2 hours. The permeate was collected and analyzed by LC/MS/MS. In the second, the amaranth hydrolyzate was incorporated into cholesterol micelles and incubated in cell cultures at concentrations of 1.0 mg/ml and 3.0 mg/ml in times of 2 h. Also, at concentrations of 3.0 mg/ml albumin and casein were added for comparison. Cholesterol content in the apical and basolateral portion was analyzed by HPLC. The third experiment was to evaluate the exposure of the hydrolyzate at concentrations of 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml and 3.0 mg/ml, in times of 2 h and 12 h. After this period, the

extraction of total RNA, evaluation of yield and integrity of the material was performed; quantitative measurement of mRNA expression by RT-PCR and relative quantification of ΔCT expression of the ABCA1, ABCG1, ABCG8, NPC111, AMPK, HMGR and SREBP-2 genes from Caco-2 cells and hamster intestinal tissue, collected in previous assays, were finalized. Results: In cholesterol permeation there was no difference between the concentrations of the protein hydrolysates and control, but the amaranth hydrolyzate at 1.0 mg/ml showed a tendency to decrease the cholesterol absorption ($p = 0.05$). Exposure of Caco-2 cells to peptides for 2 h resulted in a decrease in ABCA1, NPC111, AMPK, HMGR and SREBP-2 mRNA levels at concentrations of 3.0 mg/ml. The exposure time of 12h presented results similar to the time of 2h. Only the gene expression of ABCG8 was influenced by the amaranth protein isolate in the *in vivo* experiment. Conclusion: From the above, we can conclude that amaranth peptides influence the metabolism of cholesterol by genetic mechanisms. Therefore, it becomes an alternative to be introduced in the diet of healthy individuals and in patients with hypercholesterolemia, aiming at the prevention of aggravations and as a strategy of additional therapy in the control of plasma LDL-c levels. However, more studies should bedone with animals and humans to define the dose-efficiency for diet.

Key words: hypercholesterolemia, amaranth, peptides, cholesterol transporters.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Alanina	Ala	A
Cisteína	Cys	C
Ácido Aspártico	Asp	D
Ácido Glutâmico	Glu	E
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Lisina	Lys	K
Leucina	Leu	L
Metionina	Met	M
Asparagina	Asn	N
Prolina	Pro	P
Glutamina	Gln	Q
Arginina	Arg	R
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Valina	Val	V
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y

ABCA1	Cassete de ligação com ATP sub família A membro 1
ABCG1	Cassete de ligação com ATP sub família G membro 1
ACAT-2	Acil-CoA colesterol aciltransferase
AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
ApoA-1	Apolipoproteina A1
ApoB-100	Apolipoproteína B-100
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DPP-IV	Dipepeptidil aminopeptidase IV
ECA	Enzima conversora de angiotensina
HDL	Lipoproteina de alta densidade
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HMGR	3-hidroxi-metilglutaril coenzima A redutase
IDL	Lipoproteína de alta densidade
LDL	Lipoproteina de baixa densidade
LDLr	Receptor de LDL
LXR	Liver X receptor
MTP	Proteina de transferencia microssomal
NPC1L1	Niemann-Pick C1 Like 1
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
PCSK9	Proteina conversora subtilisina/kexina type 9
PPARs	Peroxisome proliferator-activated receptors
RXR	Receptor X retinoico
SREBP1c	Proteina de ligação do elemento de regulação do esterol 1c
SREBP2	Proteina de ligação do elemento de regulação do esterol 2

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17
1.1. ABSORÇÃO E SÍNTESE DE COLESTEROL 18
1.2. COLESTEROL E DIETA 22
1.3. PEPTÍDEOS BIOATIVOS 25
1.4. AMARANTO 27
1.4.1. Potencial hipocolesterolemiante do amaranto 29
1.4. JUSTIFICATIVA 32
2. OBJETIVO 33
2.1. OBJETIVO GERAL 33
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 33
3. MATERIAIS E MÉTODOS 35
3.1. AMOSTRA 35
3.2. ISOLAMENTO PROTEICO DA FARINHA DE AMARANTO 35
3.3. CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA E DO ISOLADO PROTEICO 36
3.4. PERFIL DE AMINOÁCIDOS DA FARINHA DE AMARANTO 37
3.5. HIDRÓLISE IN VITRO DO ISOLADO PROTEICO 38
3.5.1. Grau de hidrólise 39
3.6. LINHAGENS E CULTIVO DE CÉLULAS CACO-2 39
3.6.1. Teste de citotoxicidade 40
3.6.2. Transporte transepitelial de peptídeos de farinha de amaranto em células Caco-2 40
3.6.3. Identificação de peptídeos 41
3.6.4. Solubilização micelar de colesterol em células Caco-2 42
3.6.5. Quantificação de colesterol em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) 43
3.6.6. Análise da expressão gênica em células Caco-2 44
3.7. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO TECIDO INTESTINAL DE HAMSTERS 46
3.7.1. Consumo alimentar e ganho de peso 47
3.7.2. Coleta de material biológico 48
4. ANÁLISES DOS RESULTADOS 51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 53
5.1.CARACTERIZAÇÃO DE FARINHAS E ISOLADO PROTEICO 53
5.1.1.Composição centesimal 53
5.1.2.Análise do perfil de aminoácidos 54
5.2.ENSAIOS EM CÉLULAS CACO-2 56

5.2.1.Citotoxicidade em células Caco-2 56
5.2.2. Análise dos peptídeos do isolado proteico de amaranto..... 57
5.2.3. Análise do efeito do isolado proteico na permeação de colesterol em células Caco-2 63
5.2.4. Efeito de exposição crônica do hidrolisado proteico em células Caco-2..... 66
5.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NO TECIDO INTESTINAL DE HAMSTERS..... 81
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 87
7. CONCLUSÃO..... 89
8. REFERÊNCIAS 91

1. INTRODUÇÃO

Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNT) são um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial de Saúde estima que as DCNT são responsáveis por 61% das mortes ocorridas no mundo. No Brasil, há um comportamento semelhante, em 2002 o Sistema Único de Saúde gastou 69% do orçamento com o tratamento destas doenças e em 2009 foram as principais causas de óbito (WHO, 2008; BRASIL, 2002;2009).

Ainda que as mortes por doenças cardiovasculares (DCV) tenham sido reduzidas em relação ao século anterior devido a melhorias nos tratamentos clínicos e intervencionistas, e também menor exposição a agentes infecciosos; a morbidade permanece crescente, refletindo grande consumo de recursos do setor de saúde (ROSA *et al*., 2007; HSU *et al*. 2013). A morbidade está associada a uma variedade de fatores de risco modificáveis, incluindo peso, fumo, consumo de álcool, dieta rica em ácidos graxos saturados e estresse (YUSUF *et al*., 2004). A mudança no estilo de vida é fator determinante para a redução dos fatores de risco para as DCV.

A dieta possui um papel determinante na prevenção e no desenvolvimento dessas doenças. A alimentação é considerada um dos fatores modificáveis mais importantes para o risco de agravos; 80 % dos casos de doenças coronarianas poderiam ser evitados com alterações nos hábitos alimentares, nos níveis de atividade física e no uso de produtos derivados do tabaco (WHO, 2003;2008). A ingestão de colesterol de fontes alimentares nas sociedades ocidentais é de cerca de 0,3 a 0,4 g/dia, cerca de 55% do consumo é derivado de carne e peixe, 25% derivado de ovos e 20% de produtos lácteos. Estima-se que melhorar os hábitos alimentares pode reduzir a LDL-c até 25-

30%. Considerando o aumento de 3% no risco de DCV para cada porcentagem de elevação dos níveis de LDL- c, o impacto dos hábitos alimentares nos eventos cardiovasculares implica em um risco considerável (JENKINS*et al*., 2003;BOER *et al*., 2018).

O padrão alimentar e o estilo de vida saudável ganharam evidência em estudos epidemiológicos observacionais e de intervenção, como o DASH (Dietary Approachs to Stop Hypertension), o INTERHEART e o PREDIMED (PREvención con DIeta MEDiterránea), e ratificaram as diretrizes nutricionais para a manutenção da saúde cardiovascular, preconizando dieta isenta de ácidos graxos trans, consumo < 10% do valor energético total de ácidos graxos saturados para indivíduos saudáveis e < 7% para aqueles que apresentarem risco cardiovascular aumentado (FALUDI, 2017).

1.1. ABSORÇÃO E SÍNTESE DE COLESTEROL

O colesterol desempenha importantes funções nos seres vivos, sendo componente estrutural das membranas biológicas, precursor do colecalciferol (vitamina D3) e de hormônios esteroides (cortisol, aldosterona, estrogênios, testosterona); além de atuar no processo de absorção dos lipídeos, uma vez que também é precursor dos ácidos biliares (SANTOS, 2001; BASSO, 2007).

O intestino e o fígado, em conjunto, possuem um papel importante no controle do metabolismo lipídico; no lúmen intestinal, o colesterol presente é derivado de muitas fontes: dieta, bile, secreção intestinale descamação epitelial (COHN *et al*., 2010; VAN DER WUL*P et al*., 2013). Este colesterol é solubilizado por sais biliares em agregados macromoleculares (compostos por sais biliares, ácidos graxos, monoglicerídeos,

fosfolipídios e colesterol) e conduzidos até as membranas dos enterócitos (GOODMAN, 2010).

No lúmen intestinal, há agregados macromoleculares envolvidos com a absorção de lipídeos: vesículas unilamelares e micelas mistas. As primeiras são partículas com centenas de ângstroms de diâmetro, pobres em ácidos biliares, contendo fosfolipídeos, ácidos graxos, monoglicerídeos e colesterol. As segundas são muito mais ricas em ácidos biliares, são partículas menores com diâmetros inferiores a 100 Å e compostas principalmente de ácidos biliares e colesterol com menores quantidades de fosfolipídeos que as vesículas (WOOLLETT *et al*., 2006).

As micelas possuem característica anfipática: são solúveis em água e capazes de facilitar o transporte intraluminal, facilitando a absorção de lipídeos através da borda em escova das células intestinais (MARRINK e MARK, 2002).

No conteúdo micelar, em pH levemente ácido, derivados lipídicos tornam-se protonados e permeiam a membrana ou temporariamente se agregam a ela. O colesterol é absorvido por transportadoresNPC1L1.ABCA1secreta a substância para a circulação portal e o efluxo para o lúmem intestinal é feito por transportadores ABCG5 e ABCG8(GOODMAN, 2010). A redução da expressão gênica ou inibição destes transportadores podem inibir a absorção do colesterol e diminuir o efluxo hepático e intestinal, conduzindo a alterações no metabolismo lipídico (DEMINA *et al.*, 2016).

Metade do colesterol presente na luz intestinal é absorvido passivamente no duodeno e na porção proximal do jejuno. Mais de 95% dos ácidos biliares conjugados são absorvidos ativamente no íleo intestinal, sendo transportados pelo sistema porta-hepático. Neste transporte, os ácidos biliares estão conjugados à albumina previsto por QUINTÃO *et al*. (2011).

Os LXR também estão envolvidos na biossíntese lipídica e no metabolismo do colesterol, juntamente ao RXR e PPARs,os quais são reguladores na transcrição da família de transportadores ABC(KOLDAMOVA *et al*., 2014). A ativação global desses receptores nucleares desencadeia efeitos como aumento dos níveis de HDL, hipertrigliceridemia, esteatose hepática, aumento da excreção de colesterol na bile e redução na eficiência da absorção intestinal. O PPAR-α, é muito estudado em hepatócitos, pois nestas células são altamente expressos devido a suas funções no metabolismo lipídico, como: captação e oxidação de ácidos graxos e na junção e no transporte de lipoproteínas (KERST*EN et al*., 2000).

Após a absorção intestinal, as enzimasACAT 1 eACAT 2 (acilCoA: colesterol aciltransferase) catalisam a esterificação de colesterol intracelular para ser incorporada a apolipoproteínas e quilomícrons (IQBAL e HUSSAIN, 2009).

Os quilomícrons são partículas produzidas pelas células intestinais, responsáveis pelo transporte de substâncias hidrofóbicas pela linfa e pelo sangue. Os lipídeos provenientes da dieta (triglicérides, fosfolípides, colesterol e seus ésteres) são agregados à apolipoproteína B-48 em quilomícrons nascentes. Enquanto circula pelo sistema linfático, os quilomícrons nascentes passam à circulação do fígado e são drenados via duto torácico para a corrente sanguínea (DANIELS *et al*., 2009).

A síntese endógena de colesterol consiste em outra etapa de controle do metabolismo. A enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA) redutase ou HMGR catalisa a conversão de HMG CoA a mevalonato, cujo passo é determinante não somente na síntese de colesterol, mas também na de isoprenoides não esteróis (GOLDSTEIN e BROWN, 1990; JO e DEBOSE-BOYD, 2010). O intestino, os tecidos reprodutivos e o córtex adrenal possuem a capacidade de produzir colesterol, mas a

produção majoritária se encontra no fígado pela síntese *de novo* de colesterol na via do mevalonato (COSKUN *et al*., 2013).

BROWN e GOLDSTEIN (1997) mostraram que tanto a enzimaHMGR quanto o LDLr (receptor de LDL) são regulados e coordenados por fatores de transcrição denominados SREBPs (*sterol regulatory element binding proteins*). As isoformas SREBP-1a e 1c modulam a expressão de genes envolvidos na síntese de ácidos graxos, enquanto que o gene codificante do SREBP-2 regula a expressão de genes envolvidos na síntese de colesterol. Tratamentos com estatinas e o uso de inibidores da síntese de colesterol fazem com que esta via seja ativada (MA *etal*., 2014).

Por outra via, estes fatores são regulados pela AMPK que também está envolvida na oxidação de ácidos graxos e exocitose de lipoproteínas (PENG *et al*., 2012). Resultados recentes indicam que a ativação da AMPK ocorre após o aumento da razão AMP/ATP, no meio intracelular.O desligamento dos processos anabólicos como síntese de ácidos graxos, triglicérides e colesterol, por esta proteína, inicia com consumo de ATP e inativa SREBP-1 e HMGR. A ativação da AMPK pode inibir ou fosforilar enzimas chave da biossíntese lipídica hepática (LIU *et al*., 2014)

Os lípides sintetizados no hepatócito, como triglicérides, fosfolípides e colesterol são conjugados à molécula de apo B-100 nascente, por intermédio de proteína de transferência microssomal (MTP). Assim, as partículas de VLDL são secretadas na circulação, após a ação de lipoproteína lipase, transformam-se em IDL, e em LDL, que no final da cascata metabólica está enriquecida em colesterol esterificado. As LDL são as principais fornecedoras de colesterol aos tecidos periféricos. Já as partículas HDL, possuem múltiplas origens.Uma pequena porcentagem é gerada durante o metabolismo de VLDL e quilomícronse o restante pela produção hepática e intestinal de apo A, que

irá se incorporar às HDL na circulação (DANIELS *et al*., 2009; QUINTÃO *et al.*, 2011).

1.2. COLESTEROL E DIETA

Diversos estudos avaliam a interferência da dieta nas alterações dos níveis plasmáticos de colesterol total e suas frações. Entretanto, poucos estudos sobre o metabolismo do colesterol ressaltam o fato de que menos de um terço do colesterol presente no lúmen intestinal provém da dieta e dois terços a três quartos correspondem à origem endógena (WILSON e RUDEL, 1994).

Alimentos que contém fitoesteróis e seus correspondentes saturados, como o estanol, reduzem a absorção do colesterol e, portanto, reduzem os níveis plasmáticos de LDL-c (JESCH e CARR, 2006). Alguns estudos, por meio de um sistema de soluções de bile *in vitro*, demonstraram que o sitosterol reduz a solubilização micelar de colesterol, com consequente diminuição da sua absorção.

SANZ-BUENHOMBRE *et al.* (2016), após realizarem a digestão *in vitro* de extrato de uva, verificaram que os compostos fenólicos bioacessíveis exerceram efeito sobre biomarcadores do metabolismo do colesterol, sendo capazes de modular a expressão de transportador e receptor NPC1L1 e LDLr, respectivamente, reduzindo o conteúdo de LDL no plasma, já que fitoesteróis e colesterol utilizam uma via comum de absorção nos enterócitos. Neste sentido, os transportadores tem sido alvo de investigação para a inibição da absorção de lipídeos (ácidos graxos) e colesterol (SABEVA *et al*., 2009; TRISAT *et al*., 2017).

FROTA *et al*. (2008) compararam o efeito hipocolesterolemiante do grão do feijão caupi e do seu isolado proteico em hamsters. Verificaram que o feijão integral e sua proteína promoveram uma redução de 49 e 20 %, respectivamente, nos níveis séricos de colesterol total quando comparados ao controle. Esse resultado mostra a importante contribuição da proteína vegetal no controle da hipercolesterolemia.

Há alguns anos, as diretrizes priorizam a mudança no estilo de vida, prática de atividade física, adequação da dieta e mudança comportamental. Para demonstrar as categorias de níveis de evidências e os efeitos de certos nutrientes na saúde foram elaborados os Quadros (1 e 2) a seguir (QUINTÃO *et al*., 2011).

Quadro 1. Descrição do tipo e impacto da evidência

Categoria/ Impacto	**Descrição do tipo da evidência**	**Descrição do impacto da evidência**
A	Ensaios clínicos aleatórios de maior número de participantes e adequadamente controlados	
B	Pequenos ensaios controlados	
C	Estudos observacionais e metabólicos	
D	Experiência clínica	
1		Evidência muito forte
2		Evidênciamoderadamente forte

3		Tendência forte

Fonte: Adaptado de QUINTÃO *et al*., 2011.

Quadro 2. Efeito do componente alimentar

Componente alimentar e efeito	**Evidência**
Ácidos graxos saturados (SAT)	
Aumento da incidência de doença coronariana	C2
Redução do consumo de SAT, diminuindo risco para doença coronariana	A1, B1
Ácidos graxos trans (TRANS)	
Elevam a concentração sérica de LDL-c	A2
Associação entre o consumo e a incidência de doença coronariana, apoiada por estudos prospectivos	C2
Colesterol	
Consumo elevado: aumenta a concentração sérica de LDL-c	A2, B1
Redução no consumo: diminui a concentração de LDL-c na maioria das pessoas	A1, B1
Ácidos graxos monoinsaturados (MONO)	
Em relação ao SAT, reduzem a concentração de LDL-c	A2, B2

Não diminuem HDL-c e nem aumentam TG	A2, B2
Dietas ricas em mono, proveniente de vegetais, associadas com baixo teor de gordura total reduzem o risco cardiovascular	C1
Ácidos graxos poli-insaturados (POLI)	
POLI linoleico em substituição ao SAT reduz LDL-c	A1, B1
Causam discreta redução de HDL-c em comparação ao SAT e MONO	B2
Substituição de gordura SAT por POLI reduz o risco cardiovascular	A2, B2
Fitoesteróis/ estanóis	
Consumo (2-3g/dia) reduz LDL-c entre 6% e 15%	A2, B1
Proteína de soja	
Consumo elevado causa pequena redução de LDL-c, especialmente quando em substituição de gordura de origem animal	A2, B2
Ácidos graxos ômega-3	
Múltiplos mecanismos de redução de doença coronariana; estudos de prevenção secundária sugerem que altas doses reduzem o risco de evento coronariano e a taxa de mortalidade	A2, C2

Fonte: Adaptado de QUINTÃO *et al*., 2011.

1.3. PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Várias pesquisas têm sido realizadas buscando evidenciar o efeito de proteínas e seus derivados, incluindo peptídeos com atividade biologicamente ativa. Estes são

derivados proteicos que exercem em humanos efeitos fisiológicos, semelhantes a hormônios. São encontrados em vegetais, ovos, leite, peixes e em carne bovina (ERDMANN *et al., 2008).*

Há três maneiras de peptídeos serem liberados no trato digestório: pela ação enzimática do processo digestivo, pela digestão microbiana intestinal e durante o processamento de alimentos, como a fermentação (MÖLLER *et al*., 2008). Esses hidrolisados proteicos contêm mais de 50 % de peptídeos, com resíduos de 2-50 aminoácidos por molécula (ERDMANN *et al*., 2008). Os peptídeos podem exibir diversas atividades, dependendo da sua sequência de aminoácidos. Eles podem atuar de forma imunomodulatória, antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, opióide, anti-hipertensiva e hipocolesterolêmica(HARTMANN e MEISEL, 2007).

Os peptídeos IAEK, VPDPR e IAVP têm comprovada ação hipocolesterolemiante, já que o primeiro inibe a absorção do colesterol, o segundo inibe a absorção de gorduras em animais com dieta rica em lipídeos e o terceiro atua como inibidor da HMGR *(*NAGAOKA *et al.,* 2001*;* DZIUBA *et al.,* 2003*;* TAKENAKA *et al.,* 2003*;* PAK *et al.,* 2005a, 2005b).

Hidrolisados proteicos e peptídeos isolados de vegetais já apresentam comprovada capacidade hipocolesterolemiante por se complexarem com HMGR ou com ácidos biliares, desestabilizando a formação micelar e/ou interferindo nos transportadores celulares, reduzindo a absorção de colesterol (DZIUB*A et al.*, 2003; ERDMAN*N et al*., 2008; TIENG*O et al*., 2011; ZHAN*G et al*., 2012).

Resultados prévios indicam que o hidrolisado proteico do grão de amaranto, inclusive o processado, é capaz de diminuir a solubilização micelar de colesterol e inibir a ação enzimática *in vitro* da HMGR, em aproximadamente 44% e 60%, respectivamente, para o grão cru (CARLOS-MENEZES, 2013).

Em ratos alimentados com ração adicionada de proteínas de tremoço branco, foi observada uma redução substancial de lipídeos plasmáticos, em aproximadamente 30%, na fração VLDL+LDL. A redução de colesterol foi associada à estimulação dos receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDLr) demonstrado em células HepG2 *in vitro* (SIRTORI *et al.*, 2004). Corroborando com estes resultados, outro estudo demonstrou uma superexpressão do fator de transcrição SREBP-2, do LDLr e da síntese de HMGR, embora tenha havido uma inibição do sítio ativo desta enzima pelos peptídeos do tremoço (LAMMI *et al*., 2014).

1.4. AMARANTO

O amaranto desperta grande interesse entre os pesquisadores, devido às características nutricionais e funcionais que ele apresenta, além do uso potencial em indústrias alimentícias. Ao final da década de 80, o Conselho Nacional de Pesquisas dos Estados Unidos da América considerou o amaranto como um dos mais promissores alimentos do milênio (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989).

O amaranto (fotos em Figura 1) é classificado como dicotiledônea da família *Amaranthaceae*, o qual inclui mais de 70 gêneros. O gênero *Amaranthus* possui mais de 60 espécies, a maioria deles está no continente Americano. O grande número de variedades é refletido em diversas denominações: amaranto (espanhol e português); kiwicha, achita, coyo, achis, qamaya (Peru); coimi, millmi e inca pachaqui o grano inca (Bolivia); sangorache, ataco, quinua de castilla (Equador); millmi (Argentina); alegría, huanthi (México); rejgira, ramdana, eeerai (Índia); een, choy, yin choy, in-tsai, hsien tsai, xian ca (China) (ROBERTSON, 1981; RASTOGI e SHUKLA, 2013).

Figura 1. a) Da esquerda para a direita: *A. hybridus, A. retroflexus, A. caudatus, A. cruentus*. b) Plantação de amaranto no cerrado brasileiro. Cortesia do Dr. C. Spehar – Embrapa Cerrados.

A. cruentus L., *A. caudatus* L. e *A. hypochondriacus* L. (Pal e Khoshoo, 1974; TRANSUE *et al*., 1994). O grão possui alto valor proteico (13-18 %), e a composição de aminoácidos é próxima ao requerido para a dieta(FERREIRA e ARÊAS, 2004; FERREIRA *et al*., 2007).

O grão de amaranto apresenta majoritariamente, globulinas e albuminas, e em menor ou nenhuma quantidade, proteínas de estoque (prolaminas e glutelinas). As albuminas são proteínas globulares citoplasmáticas de baixo peso molecular, que desempenham diversas funções em humanos. As globulinas são compostas de globulina 11S, globulina-P e uma pequena parte de globulina 7S. A globulina 11S possui uma estrutura quaternária dodecamérica, com subunidades ácidas e básicas ligadas por pontes dissulfídicas. A globulina-P é composta por molécula unitária, com massa molecular e composição polipeptídica similar a 11S, porém tendem a se polimerizar e contém mais subunidades monoméricas de 56 kDa. As glutelinas também possuem características moleculares semelhantes (SEGURA-NIETO *et al.*, 1992; KONISHI *et al.*, 1991; MARTÍNEZ *et al*., 1997; AVANZA e AÑÓN, 2007). A baixa quantidade de glutelina torna o consumo do grão indicado para portadores de doença celíaca (ALVAREZ-JUBETE *et al*., 2009). A doença celíaca é caracterizada pela má absorção de nutrientes resultante de uma inflamação intestinal após a ingestão de gliadinas e

glutelinas, proteínas encontaradas em grande quantidade no trigo, centeio, cevada e aveia (FARREL e KELLY, 2002).

O conteúdo de vitaminas e minerais também é considerável, cálcio, fósforo e ferro estão presentes em quantidades similares aos cereais. Quantidades de fatores anti-nutricionais como fitatos são insignificantes. Este pseudocereal possui compostos antioxidantes, como tocotrienois, tocoferois, flavonoides e outros compostos fenólicos (BECKER *et al*., 1981; LORENZ e WRIGHT, 1984; BRESSANI e LIGORRIA, 1994; CZERWINSKI *et al*., 2004; AMAYA-FARFAN *et al*., 2005; PASKO *et al*., 2008).

Diversos efeitos bioativos são atribuídos à proteína do amaranto como inibição da enzima DPPIV, a qual está relacionada com a hiperglicemia; redução do colesterol plasmático; ação antioxidante; efeito anti-hipertensivo; atividade antimicrobiana, prevenção de oxidação de LDL e efeito anti-helmíntico (LIPKIN *et al*., 2005; HERNANDEZ-LEDESMAe*t al*., 2008;KUMAR *et al*., 2010; RAHMAN *et al*., 2012; FILLERIA *et al*.,2017). Além destes efeitos, foi demonstrado que o amaranto possui um efeito modulador na microbiota intestinal.GULLÓN *et al.* (2016) avaliaram a fermentação do amaranto por modelo *in vitro* em fezes humanase verificaram que o amaranto possui potencial prebiótico, pois promoveu aumento na população de grupos seletos presentes na microbiota intestinal, como *Bifidobacterium spp*. e *Lactobacillus/Enterococcus*.

1.4.1. Potencial hipocolesterolemiante do amaranto

PLATE e ARÊAS (2002) verificaram que o amaranto extrusado reduziu em 50 % os níveis de colesterol total em coelhos hipercolesterolemizados. CHAVÉZ- JÁUREGUI *et al*. (2010) avaliaram o efeito hipocolesterolemiante de snacks de amaranto em 22

pacientes com hipercolesterolemia moderada do InCor (Instituto do Coração do Hospital das Clínicas de São Paulo). Neste estudo foram utilizados 50 g de snack de amaranto (cerca de 7 g de proteína/dia) e 50 g de snack de milho (placebo) durante dois meses. Porém, não se observou efeito significativo na redução de colesterol, LDL-c e triglicérides, quando comparado ao placebo. A quantidade de amaranto utilizada não foi suficiente para que suas proteínas demonstrassem algum benefício na redução do colesterol. MAIER *et al*. (2000) verificaram que o colesterol total plasmático diminuiu 4,5 % após 28 dias de intervenção dietética em humanos que consumiram 50 g de proteína de amaranto por dia.

MENDONÇA *et al*. (2009) estudaram o efeito da proteína do amaranto, na diminuição dos níveis de colesterol, em hamsters hipercolesterolemizados, os quais sofreram essa indução por dieta rica em caseína. Foi fornecido 30% de proteína na dieta, a qual era composta de 20% de caseína e 10% de isolado proteico de amaranto. Foi observado que houve uma diminuição de 48% do colesterol total plasmático no grupo que recebeu somente o isolado proteico. Mesmo quando a proteína do amaranto era adicionada de caseína, a intervenção acarretou numa redução de 27 % do colesterol total. Para as frações não HDL-c essa redução foi de 57 e 39 %, respectivamente. Isso mostra o marcante efeito hipocolesterolêmico da proteína, mesmo na presença de um agente hipercolesterolemizante.

ASSIS-VAZ (2010)analisou os níveis de colesterol de ratos Wistar, sob a ingestão de dietas diferenciadas em fontes proteicas. Os grupos experimentais (I e Icol) receberam dieta com 20 % de proteína de amaranto e os grupos controle (C e Ccol) receberam dieta com 20 % de caseína. No grupo experimental (Icol) e no grupo controle (Ccol) foi adicionado 1 % de colesterol. A dieta Icol promoveu menor concentração plasmática de colesterol total e triglicérides em comparação ao grupo Ccol. Observou-se

no fígado dos animais dos grupos experimentais (I e Icol) menor concentração de lipídeos totais e colesterol.

FREITAS (2017) analisou o conteúdo de tecido hepático e sanguíneo de animais com hipercolesterolemia induzida pela dieta e verificou que o isolado proteico de amaranto é capaz de suprimir a hipercolesterolemia mesmo na presença de ingrediente hipercolesterolemiante. Foi observado, também maior excreção de colesterol nas fezes, menor quantidade de colesterol e lipídios totais no fígado e menor concentração de colesterol total, triglicérides e LDL-c no sangue dos animais.

Os mecanismos de redução de colesterol sérico pela ingestão de isolado proteico de amaranto ainda não estão totalmente elucidados. Uma das vias de redução de colesterol pode ser a inibição da solubilização micelar do colesterol, uma vez que SOARES (2008) encontrou o peptídeo IAEK no isolado proteico do grão de *Amaranthus cruentus*, quando submetido à digestão *in vitro*. Este peptídeo está descrito na literatura como hipocolesterolemiante por inibir a absorção do colesterol em células Caco-2, poder ligante em ácidos biliares e como ativador da enzima 7 α-hidroxilase (HOWARD e UDENIGWE, 2013;NAGAOKA *et al.*, 2001).

MARTIROSYAN *et al*. (2007) avaliaram o efeito do óleo de amaranto em pacientes portadores de doenças do coração e em hipertensos obesos. Dentre os parâmetros verificados, o óleo foi eficiente em reduzir os níveis de colesterol sanguíneo.

CASTRO *et al*. (2013) estudaram o efeito do óleo do amaranto e do esqualeno em hamsters submetidos a dieta hipercolesterolemizante. Este trabalho mostrou que a fração lipídica do *A. cuentus* não reduz os níveis de colesterol plasmático, bem como os de triglicerídeos. Entretanto, aumentou a excreção de ácidos biliares nas fezes, evidenciando uma possível diminuição da solubilidade de colesterol nas micelas.

Outra hipótese para explicar o efeito hipocolesterolemiante destas proteínas vegetais é a inibição da atividade enzimática HMGR, pois há peptídeos relacionados com esta inibição, por exemplo, LPYPR e LPYP encontrados na fração glicinina da soja (HOWARD e UDENIGWE, 2013).

1.4. JUSTIFICATIVA

O grupo de pesquisa do laboratório de propriedades funcionais dos alimentos vem estudando o efeito da proteína do amaranto sob a hipercolesterolemia. De forma concomitante, estudam-se mecanismos biológicos e físico-químicos envolvidos na ação hipocolesterolemiante desta proteína. Como parte de um projeto maior, pretende-se verificar a ocorrência de peptídeos hipocolesterolemizantes na sua digestão incompleta e a elucidação dos mecanismos pelos quais o amaranto e o isolado proteico promovem a redução do colesterol plasmático.

.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos de modulação da síntese e da absorção do colesterol por meio da ação dos peptídeos provenientes da farinha de amaranto crua (*Amaranthus cruentus*).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterização da farinha de amaranto crua e do respectivo isolado proteico;
- ✓ Identificar os peptídeos do hidrolisado proteico de amaranto e os peptídeos provenientes da permeação em células Caco-2;
- ✓ Avaliar o efeito do hidrolisado na solubilização micelar e absorção de colesterol em células Caco-2;
- ✓ Avaliar o efeito do hidrolisado na expressão dos genes NPC1L1, ABCA1, ABCG1, HMGR, SREBP-2 e AMPK nas células Caco-2;
- ✓ Avaliar o efeito do hidrolisado na expressão dos genes ABCG8, HMGR, SREBP - 2 e AMPK em células intestinais de hamsters.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. AMOSTRA

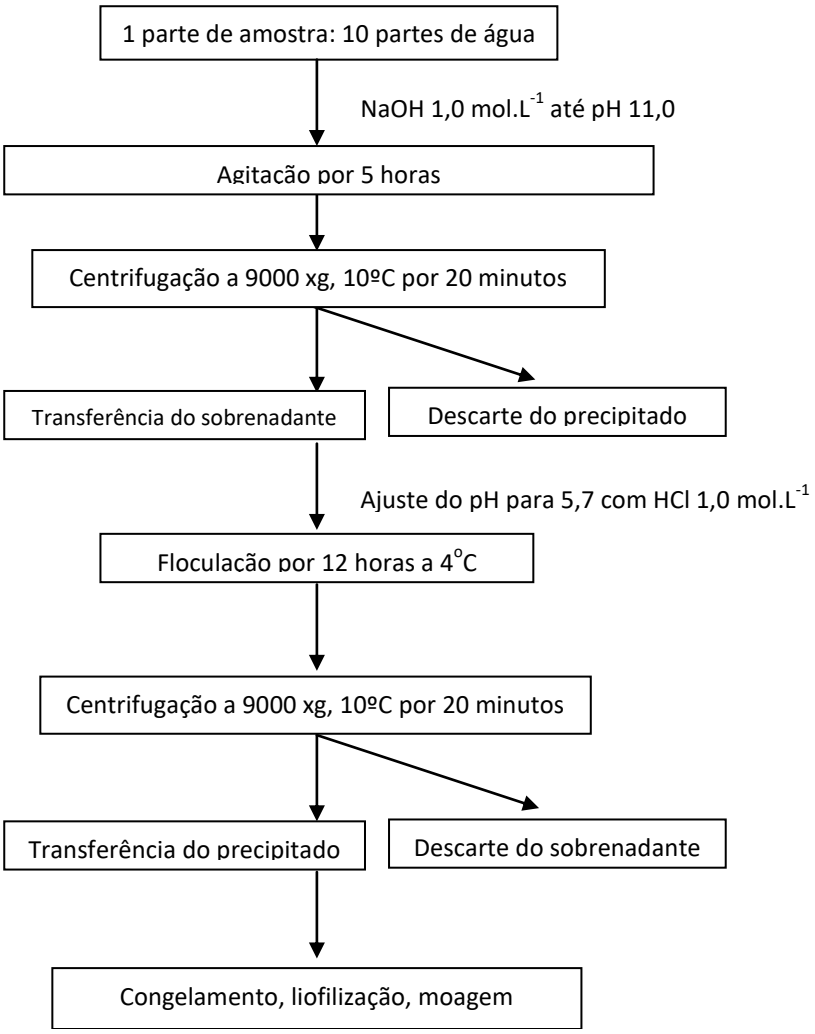
O grão de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS-Alegria) foi obtido da EMBRAPA – Cerrados (Planaltina-DF). Após o recebimento, as sujidades dos grãos foram separadas manualmente. Primeiramente, os grãos foram moídos em triturador modelo M20 da marca IKA®-WERKE e a farinha foi tamisada em peneira interna média de 0,45 mm. O produto foi armazenado até 4 ºC para utilização.

3.2. ISOLAMENTO PROTEICO DA FARINHA DE AMARANTO

O isolamento foi realizado pelo princípio de precipitação isoelétrica segundo MARTÍNEZ e AÑÓN (1996), com modificações já realizadas no laboratório de Propriedades Funcionais dos Alimentos (FSP-USP). A amostra moída foi desengordurada com hexano na proporção 1:4, sob agitação durante 4 horas. Após 24 horas de secagem em temperatura ambiente, foi adicionada água destilada na farinha desengordurada na proporção 1:10. O pH foi elevado a 11 com NaOH 1 mol/L. A mistura foi agitada por 5 horas a temperatura ambiente e permaneceu em repouso por 12 horas a 4 ºC. Posteriormente, foi centrifugada a 9000 xg por 20 min a 4 ºC. Após novo ajuste do pH do sobrenadante a 5,7 com HCl 1 mol/L, o homogenato permaneceu por 12 horas a 4 ºC. Uma nova centrifugação a 9000 xg foi realizada e o precipitado foi congelado e liofilizado.

O fluxograma do isolamento proteico da farinha de amaranto encontra-se resumido na Figura 2.

Figura 2. Fluxograma do isolamento proteico da farinha de amaranto



3.3. CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA E DO ISOLADO PROTEICO

A farinha integral e o isolado proteico de amaranto foram analisados quanto ao conteúdo de umidade e de proteínas, por dissecação a 105 °C e pelo método de micro-Kjeldahl, respectivamente (AOAC, 2010). Os fatores de conversão de nitrogênio em proteína utilizados foram 5,85 para a farinha e 6,12 para o isolado proteico, valores obtidos por cálculo de acordo com o perfil de aminoácidos da farinha e do isolado proteico analisado (SOSULSKY e IMAFIDON, 1990; MENDONÇA, 2009).

3.4. PERFIL DE AMINOÁCIDOS DA FARINHA DE AMARANTO

As análises do perfil de aminoácidos totais e de triptofano foram realizadas no laboratório CBO Análises, localizado na cidade de Campinas, São Paulo. A preparação das amostras para análise de aminoácidos totais envolveu as etapas de hidrólise para liberação dos aminoácidos, preparação dos hidrolisados através de secagem e derivatização e separação dos derivados de feniltiocarbamil por cromatografia líquida de alta eficiência, de acordo com metodologia proposta por WHITE *et al. (*1986). Para a realização da hidrólise, foram pesados cerca de 0,2 g de proteína e norleucina (utilizada como padrão interno), a razão amostra/padrão interno requerida é aproximadamente 15:1. A seguir foram adicionados 100 mL de ácido clorídrico 6 mol.L-1 contendo 0.1% de fenol, a mistura foi refluxada por 20 h a 110 °C. Após resfriamento, o volume foi completado para 200 mL e a amostra foi filtrada em filtro de fibra de vidro.

Para remoção de proteínas de alta massa molecular e lipídeos, a amostra foi eluída em cartucho C18 Sep-pak. Um mililitro de amostra foi adicionado a 2 mL de solução 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA) em água deionizada e metanol (70:30 v/v). A derivatização foi então iniciada pela adição de 20 µL de solução contendo etanol 95% v/v, água, trietilamina e fenilisotiocianato na proporção em volume 7:1:1, resultando nos derivados feniltiocarbamil.

Os derivados foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa Nova-Pak C18, de 3,9 x 150 mm, com forno de coluna a 38 °C. A fase móvel consistiu em dois eluentes. O eluente A era formada por 940 mL de acetato de sódio 0,14 mol.L-1, pH 6,4, contendo 0,05% de trietilamina, e 60 mL de acetonitrila grau HPLC. O eluente B era formado por 60% de acetonitrila grau HPLC e 40% de água deionizada (v/v). O gradiente linear de eluição utilizado foi de 0-100% de B. O tempo total de análise foi de 25 minutos. Os derivados feniltiocarbamil foram

detectados por absorção no UV, com utilização do comprimento de onda 254 nm. As áreas dos picos foram comparadas às da mistura padrão de aminoácidos Pierce (Amino Acid Standard H).

Os valores de triptofano foram determinados por espectrofotometria com leitura a 590 nm através de método descrito por SPIES (1967), usando-se hidrólise enzimática com pronase a 40 °C por 24 horas, uma vez que a hidrólise ácida destrói este aminoácido.

3.5. HIDRÓLISE IN VITRO DO ISOLADO PROTEICO

A hidrólise dos isolados teve a finalidade de simular a digestão gástrica e intestinal humana, segundo MÉGIAS *et al*. (2009) com modificações realizadas por CARLOS-MENEZES (2013). Em solução de 2% de proteína em NaCl 30 mM a 37 °C, pH = 2, foi adicionada pepsina enzima/substrato 1:1000 m/m. A mistura foi deixada em incubação por 2 horas em banho-maria com agitação constante (modelo SW22 - JULABO). O pH foi modificado para 7 com adição de NaOH 1N, houve subsequente adição de pancreatina, na mesma proporção, por mais 1 hora, totalizando 3 horas de digestão enzimática para se obter um hidrolisado com grau de hidrólise rico em peptídeos.

A reação foi interrompida com aquecimento de 80 °C por 20 minutos e os hidrolisados foram submetidos à centrifugação a 9880 × *g*por 20minutos separando os sobrenadantes para as análises posteriores. Para isolar peptídeos de baixo peso molecular, o sobrenadante foi centrifugado em dispositivos Millipore AMICON de 3 kDa de ultra filtração por 40 min em 7500 × g à 4 ºC.

3.5.1. Grau de hidrólise

O grau de hidrólise do isolado proteico foi determinado de acordo com HOYLE e MERRIT (1994), com modificações de HARRIMAN *et al*. (2013). Aliquotas dos sobrenadantes dos hidrolisados foram agitadas com solução de TCA 20% na proporção 1:1 para obtenção da fração solúvel final em TCA 10%. Após repouso de 30 minutos, a mistura foi centrifugada a 3000× *g* e o conteúdo proteico solúvel do sobrenadante foi determinado pelo método de Kjeldahl. O resultado foi expresso em porcentagem de peptídeos solúveis em relação à proteína total da amostra.

A análise foi realizada em triplicata. Depois de variados testes foi escolhido o grau de hidrólise de 58,71%. Valores elevados de grau de hidrólise não são desejados, pois, resultam em aminoácidos livres, devido a uma quebra completa da cadeia proteica. Valores baixos indicam uma quebra insuficiente resultando em pequenas quantidades de peptídeos (XIA *et al*., 2012)

3.6. LINHAGENS E CULTIVO DE CÉLULAS CACO-2

A linhagem celular Caco-2 é oriunda de um adenocarcinoma de cólon humano e atualmente é modelo celular mais empregado. A partir da década de 80, este modelo foi largamente empregado para investigar os processos de absorção intestinal in vitro. Esta linhagem tem sido a mais citada e extensamente aceita como modelo de predição da absorção intestinal para fármacos e nutrientes. Esse modelo permite aplicar soluções de proteínas ou peptídeos, na camada apical das células Caco-2, e coletar os permeatos na camada basolateral (ARTURSSON e BORCHARDT, 1997; BALIMANE e CHONG, 2005; MEGÍAS et al., 2009). Alguns trabalhos demonstraram o efeito

hipocolesterolemiante de hidrolisados proteicos em células Caco-2 (NAGAOKAet al., 2001; HOWARD e UDENIGWE, 2013)

As células Caco-2 foram cultivadas em meio DMEM (Modified Dulbecco Eagle Médium) com alta concentração de glicose 4,5 g/L suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 1% de solução de Glutamina 200 mM e antimicrobianos (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL). As células foram utilizadas entre os repiques de passagem 20 a 70 e mantidas em cultura utilizando garrafas de 75 cm^2, com substituição de meio a cada dois dias. O sub-cultivo foi realizado quando a cultura atingir no mínimo 80% de cobertura da garrafa.

3.6.1. Teste de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado para garantir que as amostras a serem utilizadas não afetassem a viabilidade celular. As células Caco-2 foram semeadas em placas de cultura de células de 12 poços na densidade de 5 $x10^4$ células/cm^2 e cultivadas por 21 dias (37°C, 5% de CO_2). As células foram expostas a quantidades crescentes de hidrolisado proteico de amaranto. Após 12h de incubação, o conteúdo das placas foi transferido para uma microplaca de 96 poços e a viabilidade celular foi determinada pelo kit Cytotox 96® Non-Radioactive. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.6.2. Transporte transepitelial de peptídeos de farinha de amaranto em células Caco-2

Para o experimento de permeabilidade, as células foram semeadas em placas transwell de 12 poços com suporte de policarbonato, 12 mm, 1,12 cm^2 na densidade de 6 $x10^4$ células/cm^2. As células foram mantidas em incubadora (37°C, 5% de CO_2) até a

formação da monocamada (21 dias após semeadura). O experimento de transporte de peptídeos foi realizado durante 2 h (YUN *et* al., 2004). As concentrações utilizadas basearam-se no ensaio de citotoxicidade, garantindo a viabilidade e integridade celular. O isolado proteico digerido e liofilizado foi ressuspenso em tampão Hanks para ser adicionados nas células Caco-2. Assim, 500 µL de diferentes concentrações: 0,5 mg/mL, 1 mg/mL e 3 mg/mL, diluídos em tampão foram adicionados na parte apical da placa. Na parte basolateral foi adicionado 1,5 mL de tampão Hanks sem amostra. Após 120 min, o conteúdo da parte basolateral foi coletado para posterior identificação dos peptídeos do isolado que ultrapassaram a camada celular. A integridade da monocamada celular foi monitorada por meio da mensuração da resistência elétrica transeptelial (TER) em equipamento Millicell®. Somente foram considerados aptos para o experimento os poços que apresentaram valor de TER acima de 300 Ω.

3.6.3. Identificação de peptídeos

Para avaliar os peptídeos oriundos da permeação das células Caco-2 e hidrolisados proteicos de amaranto, as amostras foram dissolvidas em ácido fórmico 0,5% e depositado em placas de 96 poços em injetor automático SIL-20A para análise em espectrômetro de massas LC/MS equipado com ionizador ESI e analisador de massas IT-TOF (Shimadzu, Japão). Os peptídeos foram separados em coluna Discovery C18 1.5 (2 × 50 mm) usando como fase móvel 0,5% ácido fórmico (A) e acetonitrila 90% contendo 0,5% de ácido fórmico (B) em um gradiente linear de B para A de 0 a 100% durante 15 min, sob fluxo constante de 0,2 $mL.min^{-1}$.

Após confirmação dos estados de carga, foi realizado o sequenciamento *de novo* de peptídeos, no qual o íon de interesse foi selecionado em uma janela de massa de 0,5 m/z e fragmentado. Os espectros foram obtidos na faixa de 100 a 3000 m/z. A

aquisição dos dados se deu pelo software LCMS Solution Suite (Shimadzu). O espectro gerado foi analisado pelo software Peaks Mass Spectrometry (BioinformaticsSolutions Inc., Canadá), esse software foi usado para o sequenciamento *de novo*. A sequência peptídica gerada foi comparada com um espectro teórico, obtido pelo Protein Prospector.

3.6.4. Solubilização micelar de colesterol em células Caco-2

Este método foi adaptado do descrito por ZHANG *et al*. (2012) e JESH e CARR (2006). A solução micelar foi elaborada contendo concentrações finais de 0,5 mmol/L de colesterol, 2,4 mmol/L de fosfatidilcolina, 1 mmol/L de ácido linoléico e 6,6 mmol/L de taurocolato de sódio (pH 7,4), em tampão Hank's.

As suspensões foram sonicadas em banho de gelo no ultrassom (marca Elma; modelo Transsonic digital S) por 15 minutos a 100 % de potência (140 W), seguido de incubação a 37 °C por 30 minutos.

Em seguida, foram adicionados 1 e 3 mg/mL de hidrolisado proteico de amaranto e 3 mg/mL de hidrolisado de caseína e de albumina em tubos distintos. A solução final contendo a solução micelar e os hidrolisados foi sonicada por 1 minuto e incubada a 37 °C por 1 hora.

Após incubação, as soluções, inclusive do controle (micela de colesterol sem hidrolisado), foram filtradas por uma membrana de 0,22 µm. A membrana possui a finalidade de reter micelas mistas maiores que 220 Å. Deste filtrado, foi coletado uma alíquota de 250 µL e adicionado às células semeadas em placas transwell de 24 poços com suporte de policarbonato, densidade de 2 $x10^4$ células/cm^2 e tamanho de poro 0,4µm. Após 2 horas, o conteúdo da parte apical e basolateral foram coletados para posterior quantificação de colesterol. A integridade da monocamada celular foi

monitorada por meio da mensuração da resistência elétrica transeptelial (TER) em equipamento Millicell®. Foram utilizadas as células com passagem 72 de repique.

Para a avaliação do efeito inibidor dos hidrolisados na solubilidade ou na absorção do colesterol, esta substância, contida no fluído apical e basolateral das células, foi quantificada em cromatografia líquida de alta eficiência.

3.6.5. Quantificação de colesterol em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Este método foi realizado e adaptado seguindo o descrito por SALVIA-TRUJILLO *et al*. (2017).As alíquotas coletadas da porção apical e basolateral das células Caco-2, foram identificadas em quadruplicatas para o controle (solução micelar de colesterol) e para as soluções micelares de colesterol contendo hidrolisados de amaranto (1 e 3mg/mL), caseína e albumina em doses de 3 mg/mL. Para a extração do colesterol destas amostras em fluído basolateral, 750 µL foram diluídas em 2.500 µL de hexano e em 750 µL de ácido clorídrico, a solução foi homogeneizada em vortex, submetida ao ultrassom por 10 min e centrifugada a 500 ×*g*, por 5 min à 20 ºC, o sobrenadante foi coletado. A amostra homogeneizada foi adicionada de 1.000 µL de hexano, submetida ao vortex e 2 min em ultrassom, para centrifugação novamente, com coleta posterior de sobrenadante. Estes passos foram realizados três vezes. Para a extração do colesterol retirado do conteúdo apical, foi utilizado um terço das concentrações descritas acima, com repetição do procedimento.

Os sobrenadantes foram evaporados em Centrivap por 30 min e ressuspendidos em hexano, grau HPLC, homogeneizados em vortex, submetidos em ultrassom por 2 min e filtração em 0,45 µm.

A quantificação do colesterol foi realizada em equipamento da marca Shimadzu (Tokio, Japão) com coluna cromatográfica Cyano (Phenomenex). O volume de injeção foi de 20 µL. A fase móvel foi preparada com n-hexano/isopropanol (97:3 v/v), com fluxo isocrático de 1 mL/min. O detector utilizado foi o *diode array*, no comprimento de onda de 206 nm. Utilizou-se curva de calibração com padrão da Steraloids Inc-USA. As análises foram realizadas em quadruplicata.

3.6.6. Análise da expressão gênica em células Caco-2

As células Caco-2 foram incubadas com doses de 0,5, 1 e 3 mg/mL de hidrolisado proteico de farinha de amaranto nos tempos 2h e 12h, diluídas em meio de cultura. Após este período o RNA total foi extraído, utilizando o conjunto de reagentes RNeasy mini Kit (Qiagen,Germantown, MD, USA) seguindo as indicações do fabricante. O rendimento do RNA total foi avaliado por espectrofotometria no ultravioleta (UV), utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop® (NanoDrop Technologies INC., Wilmington, DE, EUA) e o grau de pureza do RNA foi determinado pela relação A260 nm/A280 nm.

A integridade do RNA foi avaliada com auxílio do equipamento bioanalyzer® 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). O cDNA foi gerado a partir de 1 µg de RNA, utilizando-se 200 ng de iniciadores aleatórios (randomprimers) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), DTT 10 mmoles/L (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), dNTPs 500 µmoles/L (GE Healthcare, AmershamBiosciences do Brasil, São Paulo, SP), 200 U de transcriptase reversa (RT) (SuperScriptTM II RT RNase H-) e tampão de RT [Tris-HCl 250 mM (pH 8,3), KCl 375 mM, MgCl2 15mM] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). O ensaio de transcrição reversa foi

realizado em termociclador PTC-200 (MJ Resarch Inc., Walthan, 55 MA, EUA) com as seguintes etapas: 25 ºC por 10 min, 42 ºC por 50 min e 70 ºC por 15 min. O cDNA obtido foi armazenado a – 20 ºC até a realização do PCR.

A expressão do RNAm dos genes de HMGCR (Hs00168352_m1), SREBP2 (Hs01081784_m1), ABCA1 (Hs01059118_m1), ABCG1 (Hs01555189_m1), NPC1L1 (Hs00245154_m1), AMPK (Hs01562315_m1), foi realizada por reação de transcrição reversa seguida de amplificação por PCR em tempo real, por procedimento previamente descrito por GENVIGIR *et al*. (2011) e normalizados com o gene UBC.

A medida quantitativa da expressão do mRNA dos genes estudados foi realizada por PCR em tempo real utilizando o sistema de amplificação TaqMan®RTPCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando-se o equipamento ABIPrism 7500 FAST (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise da expressão gênica foi realizada por método de quantificação relativa. Com a finalidade de escolher o gene endógeno mais adequado para o modelo, vários genes foram testados e analisados no programa GeNorm (Vandesompele *et al*., 2002). Os iniciadores e as sondas marcadas com fluoróforo foram fornecidos em solução 20 vezes concentrada pelo serviço “Assay by design” e/ou “Assay on demand” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

As análises de quantificação relativa da expressão de mRNA dos genes estudados foram realizadas utilizando o método do ΔCt, com base na fórmula 2-ΔΔCt. Previamente, foram calculadas as eficiências de todos os ensaios, sendo considerados adequados valores entre 90 e 110% (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Com a finalidade de monitorar a precisão dos resultados das reações de amplificação realizadas por RT-PCR, as amostras foram analisadas em sextuplicata. Foram feitos controles dos reagentes em cada conjunto de reações para avaliar possíveis contaminações.

3.7. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO TECIDO INTESTINAL DE HAMSTERS

Em experimento realizado por FREITAS (2017), foi conduzido, primeiramente, em fase aguda para conhecimento e melhor desenvolvimento do experimento, sendo um pré-teste. O ensaio biológico foi conduzido no Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP, e os animais utilizados foram adquiridos no mesmo biotério. O protocolo experimental seguiu as normas do Canadian Concilon Animal Care (OLFERT *et al*., 1993) e foi submetido ao Comitê de Ética no uso de Animais da Faculdade (CEUA FMUSP protocolo de pesquisa 088/14).

Os animais foram alojados em gaiolas com maravalha autoclavada, em local arejado. A temperatura foi controlada entre 20 e 25ºC, umidade relativa de 55 %, com janelas escurecidas para o controle do ciclo de claro/escuro de 12 horas.

Foram utilizados 13 ratos machos da linhagem Wistar (Rattus norvegiccus, variedade albinus, rodetia, mammalia), com 21 dias de idade (recém desmamados). Os animais passaram por um período de sete dias de adaptação, durante o qual receberam ração comercial NUVILAC CRI (Nuvital Nutrientes AS, Colombo-PR) e água ad libitum. Após este período eles foram submetidos a jejum de 8 horas e distribuídos por amostragem casual sistemática, conforme discriminado na figura 9, em: basal (n=1), referente ao tempo pré-dose (tempo zero); três grupos “isolado” (n=9), nas concentrações de 250, 375 e 500 mg de isolado/kg peso do animal e um grupo controle (n=3), considerando os tempos de sacrifício em 20, 60 e 120 minutos após gavagem.

No experimento real, de maior duração em relação ao primeiro, foi proposto para, que fosse possível, inferir sobre os mecanismos de ação dos peptídeos do amaranto no metabolismo lipídico. Este ensaio foi conduzido no Biotério de experimentação para ratos do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT-USP). Também foi submetido ao Comitê de Ética no uso de animais do

Instituto de Medicina Tropical da USP (IMT-USP), protocolo CPE IMT 000290A de 2014 e ao Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina FMUSP, protocolo 196 de 2014.

Foram utilizados 24 hamsters (Mesocricetus auratus), linhagem Golden Syrian, com 28 dias de idade e padrão sanitário convencional. O protocolo experimental seguiu as normas do *Canadian Concilon Animal Care* (OLFERT et al., 1993)

Os animais foram divididos, por amostragem casual sistemática, em três grupos: controle N -azul (normocolesterolêmico), controle H -amarelo (hipercolesterolêmico) e intervenção I – rosa (hipercolesterolêmico com hidrolisado de amaranto). Cada grupo consumiu uma dieta específica (Tabela 1) por 21 dias, N recebeu dieta contendo caseína e nutrientes balanceados para dieta saudável, de acordo com o preconizado para roedores; H recebeu dieta com caseína e nutrientes hipercolesterolemiantes e I recebeu dieta com isolado proteico de amaranto e nutrientes hipercolesterolemiantes. Após este período houve a eutanásia e coleta de materiais.

3.7.1. Consumo alimentar e ganho de peso

A ingestão das dietas foi determinada diariamente durante os 21 dias de experimento. A quantidade ingerida foi calculada por meio da diferença entre a quantidade ofertada e as sobras deixadas no comedouro.

Durante o período experimental os animais foram pesados em balança digital semi-analítica modelo MA-BS 2000 Marconi, duas vezes por semana no mesmo horário, para avaliar o ganho de peso.

A partir da razão entre ganho de peso e a quantidade de ração ingerida foi calculado o Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA) de cada dieta.

O Quadro 3 apresenta os dados de consumo alimentar e peso dos animais. Não houve diferença estatística entre os grupos para nenhum dos parâmetros indicados, confirmando a homogeneidade entre os animais estudados FREITAS (2017).

Quadro 3. Parâmetros de peso dos animais, ingestão de dieta e coeficiente de eficácia alimentar em hamsters após 21 dias de administração de dietas.

Parâmetro	Grupo N (n=8)	Grupo H (n=8)	Grupo I (n=8)
Peso inicial (g)	103,8 ± 8,1	105,8 ± 8,4	106,9 ± 10,2
Ganho de peso total (g)	21,3 ± 7,0	19,4 ± 4,6	20,1 ± 3,4
Ingestão total de ração (g)	107,4 ± 25,5	97,4 ± 12,0	115,7 ± 13,1
Ingestão diária média (g)	6,4 ± 1,7	6,3 ± 1,0	7,0 ± 0,8
CEA (%)	19,6 ± 4,0	19,9 ± 3,8	17,3 ± 3,4

Valores expressos em média ± desvio padrão.
CEA (Coeficiente de eficácia alimentar).

3.7.2. Coleta de material biológico

O intestino foi retirado e pesado em balança analítica (Shimadzu Modelo AX 200), identificados, acondicionados em micro tubos e congelados em gelo seco até o transporte para o Laboratório de Composição Centesimal dos Alimentos da FSP/USP, onde estes foram armazenados em ultra freezer a -80 °C até a realização das análises.

Todo o material biológico não utilizado nos experimentos foi descartado, segundo as Normas de Segurança Laboratorial, no descarte de material biológico da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os intestinos armazenados foram analisados, a fim de verificar a expressão do mRNA tecidual utilizando-se os seguintes ensaios (códigos de assay da Applied Biosystems): HMGCR (Hs00168352_m1), SREBP2 (Hs01081784_m1), ABCG8 (Hs00223690_m1) e AMPK (Hs01562315_m1), de acordo com o item 4.6.6.

Tabela 1. Composição de dieta distribuída entre os grupos N , H e I .

Ingredientes (g/kg de peso)	N	H	I
Caseína	287	287	_____
Isolado proteico de amaranto	_____	_____	271
Sacarose	50	50	50
Amido de milho	368	368	380
Celulose	100	100	100
Óleo de soja	147	11	11
Gordura de coco	____	135	135
Colesterol	_____	1	1
Bitartarato de colina	3	3	3
Mistura mineral	35	35	35
Mistura de vitaminas	10	10	10

4. ANÁLISES DOS RESULTADOS

Para as comparações de médias entre três ou mais grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguido de teste de comparação múltipla de Tukey e para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste T, as médias foram plotadas no software Statistical Package for the Social Sciences SPSS Data Editor versão 13.0 para Windows. Foi adotado o nível de significância de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1.CARACTERIZAÇÃO DE FARINHAS E ISOLADO PROTEICO

5.1.1.Composição centesimal

Os resultados das análises de composição centesimal da farinha integral, da farinha desengordurada e do isolado proteico encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Composição centesimal das amostras analisadas (base úmida).

	Farinha integral	**Farinha desengordurada**	**Isolado proteico**
Umidade ($g.100g^{-1}$)	9,1 ± 0,1	10,7 ± 0,1	5,8 ± 0,3
Cinzas ($g.100g^{-1}$)	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,0	1,0 ± 0,3
Proteínas ($g.100g^{-1}$)	14,9 ± 0,6	13,8 ± 0,9	89,0± 0,0
Lipídeos ($g.100g^{-1}$)	5,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	2,5 ± 0,7
Carboidratos* ($g.100g^{-1}$)	68,1	72,7	1,7

Resultados das triplicatas expressos em média ± desvio padrão.
* calculados por diferença.

O teor de proteínas presentes, após o processo de isolamento, está de acordo com o trabalho de ESCOBEDO-MORATILLA (2017). O amaranto sendo um pseudocereal possui teor proteico maior que outros cereais, esta característica facilita o isolamento de sua proteína (TEUTÔNICO E KNORR, 1985; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989).

Com relação à pureza, o percentual obtido de 89% está de acordo com o citado em literatura. Alguns estudos consideram aceitável o percentual de 80 a 85% de proteínas, após o isolamento da farinha de amaranto (SALCEDO-CHÁVEZ *et al*., 2002; SCILINGO *et al*., 2002). A concentração mínima de proteína preconizada para o isolado proteico de soja é 88% (ABIA, 1991).

5.1.2.Análise do perfil de aminoácidos

Foi analisado o perfil de aminoácidos durante o processamento para verificação de possíveis perdas nas frações proteicas. Como exposto na Tabela 3, houve variações esperadas na composição de aminoácidos quando comparado o isolado proteico à farinha integral.

A análise de triptofano pode ter resultado em menor solubilização do isolado proteico para quantificação em relação à farinha integral. Apesar destas modificações, os teores de aminoácidos essenciais estão acima ou semelhantes ao recomendado pela FAO (2007), exceto pela perda de valina durante o processamento.

Estes resultados corroboram com os valores de aminoácidos encontrados por MENDONÇA (2009) após o isolamento proteico do grão de amaranto, o qual promoveu a redução do colesterol plasmático em hamsters.

Tabela 3. Perfil de aminoácidos totais da farinha integral e do isolado protéico.

Aminoácido	Farinha integral de amaranto mg/100g proteina	Isolado proteico de amaranto mg/100g proteína	Recomendação FAO (2007) mg/100g proteína
Ácido Aspartico	8,3	8,4	
Ácido Glutâmico	18,6	17,3	
Serina	6,4	5,5	
Glicina	9,0	6,8	
Histidina	**2,6**	**3,2**	**1,5**
Taurina	0,0	0,0	
Arginina	9,8	11,5	
Treonina	**3,6**	**3,6**	**2,3**
Alanina	4,3	4,6	
Prolina	4,5	5,8	
Valina	**4,4**	**3,5**	**3,9**
Metionina	2,0	2,4	
Cistina	2,0	1,8	
Soma Metionina+Cistina	**4,0**	**4,2**	**2,5**
Isoleucina	**3,7**	**3,8**	**3,0**
Leucina	**6,1**	**6,5**	**5,9**
Tirosina	3,3	4,0	
Fenilalanina	4,6	4,7	
Soma Tirosina+Fenilalanina	**7,9**	**8,7**	**6,3**
Lisina	**6,2**	**5,2**	**4,5**
Triptofano	**2,2**	**1,0**	**0,6**

Aminoácidos em negrito são ditos essenciais, uma vez que nosso organismo não consegue sintetizá-los. Devem ser obtidos por dieta em quantidade recomendada pela FAO (2007).

A farinha e o isolado proteico de amaranto possuem bom perfil de leucina (mesmo sendo limitante), isoleucina, metionina, triptofano, lisina e treonina, os quais são considerados aminoácidos essenciais. Além disso, o ácido glutâmico e a arginina são abundantes na farinha e no isolado proteico de amaranto, aminoácidos considerados

importantes para o desenvolvimento cerebral e neuroprotetor na infância (KEUNEN *etal*., 2015; YI-SHEN *et al*., 2018).

Outro fator positivo é o aumento na quantidade de alguns aminoácidos hidrofóbicos, leucina, por exemplo. MARQUES *et al*. (2015) verificaram que peptídeos com sequências de aminoácidos hidrofóbicos, em feijão caupi cozido, diminuíram a solubilização micelar de colesterol em 40%, aproximadamente.

Peptídeos com resíduos de aminoácidos com N-terminal hidrofóbico e C-terminal hidrofílico, ou seja, com uma estrutura anfipática favorecem na associação com fosfolipídios, agindo na integridade da micela com consequente redução da solubilidade micelar de colesterol (HOWARD e UDENIGWE, 2013).

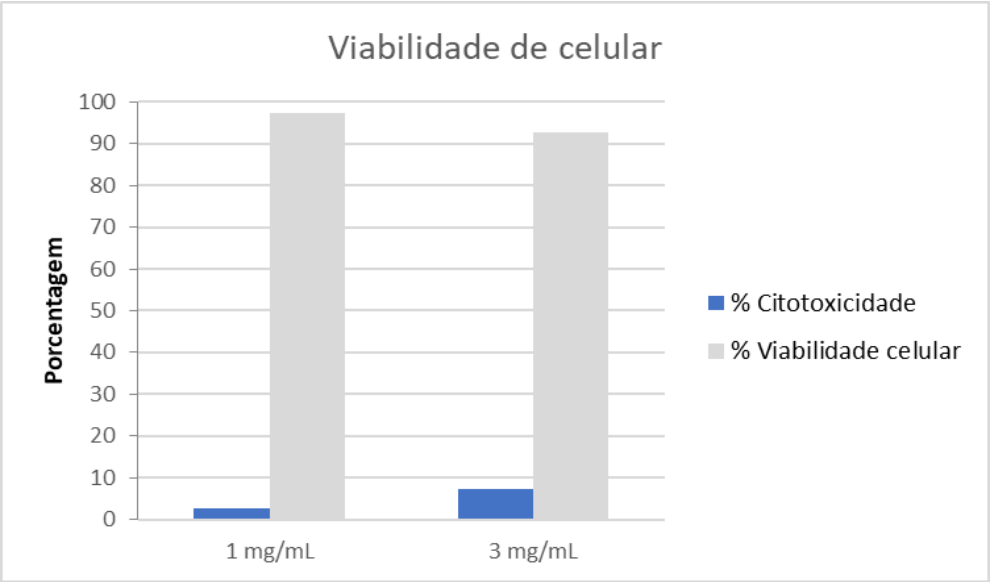
5.2.ENSAIOS EM CÉLULAS CACO-2

5.2.1.Citotoxicidade em células Caco-2

A fim de verificar o potencial tóxico do hidrolisado protéico de amaranto, foi realizado o teste de citotoxicidade com diferentes doses do hidrolisado para avaliar a viabilidade celular das células Caco-2.

De acordo com a Figura 3, podemos observar que as doses abaixo de 3 mg/mL obtiveram mais de 90% de células viáveis. Por isso, optou-se pela utilização de doses entre 0,5 mg/mL e 3 mg/mL para avaliação da permeabilidade de peptídeos, colesterol e expressão gênica de proteínas associadas a permeabilidade e modulação de colesterol.

Figura 3. Percentual de citoxicidade versus viabilidade celular das células Caco-2 na presença de diferentes doses de hidrolisado protéico de amaranto.



5.2.2. Análise dos peptídeos do isolado proteico de amaranto

As sequências mais abundantes encontradas no hidrolisado do isolado proteico de amaranto e permeatos da porção apical e basolateral de células Caco-2 estão descritas, respectivamente, nos Quadros 4, 5 e 6. Após obtenção das frações identificadas a partir da hidrólise e permeação, foi feita a confrontação com banco de dados: Blast, com busca na família *Amaranthaceae* (taxid:3563). O Blast (Basic Local Alignement Sequence Tool) é uma ferramenta básica de alinhamento local de sequências. Foram selecionados fragmentos com cobertura e identidade acima de 90% em relação ao peptídeo identificado.

Quadro 4. Sequência peptídica do hidrolisado de isolado protéico de amaranto, peptídeos similares e proteínas da família *Amaranthacea*.

Sequência peptídica observada no hidrolisado	Peptídeos similares localizados BLAST	Proteína e espécie BLAST
NSFNLPILSHL	NSFNLPILSH; NSFNLPIL; NSFNLPILRH	Globulina e Proglobulina (cadeia A) 11 S (*Amaranthus hypocondriacus*)
TALEPTNRIQA	TALEPTNRIQA	Globulina e Proglobulina (cadeia A) 11 S (*Amaranthus hypocondriacus*)
HVIKPPS	HVIKPPS; HVIKPP; H+IKPP; HIIKPP;	Globulina e Proglobulina (cadeia A) 11 S (*Amaranthus hypocondriacus*) e Isoamilase – 1 (*Amaranthus hybridus* subs. *cruentus*)
AMISPLAGLSA	AMISPLAGRLSA; AM LAGR SA; AMFQSLAGRTSA	Globulina e Proglobulina (cadeia A) 11 S (*Amaranthus hypocondriacus*)
HSSIIY	SSIIY; SSII+; SSIIF	"Proteína de transcriptase reversa", parcial, (*Amaranthus hybridus* subs. *cruentus*)
VVVPQN	VVVPQN; VVVP	Globulina e Proglobulina (cadeia A) 11 S (*Amaranthus hypocondriacus*) e Alanina aminotransferase 2 (*Amaranthus tricolor*)
VQMPVQV	VQMPV; VQPV; VQIPV	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (*Achyranthes bidentate*), catalase (*Amaranthus hybridus* subs. *cruentus*)

Quadro 5. Sequência peptídica do permeato celular da porção apical após 2h de exposição, peptídeos similares e proteínas da família *Amaranthacea.*

Sequência peptídica observada na porção apical	Peptídeos similares localizados BLAST	Proteína e espécie BLAST
DVFNPQGGR	LDVFNPQGGR; DV+ P+ GR; DVYTPEAGR	Globulina e Proglobulina (cadeia A) 11 S (*Amaranthus hypocondriacus*)
FVVLK	FVVLK	Putativa transmembrana (*Amaranthus hypochondriacus), (Amaranthus acanthochiton), (Amaranthus arenicola*)
RAISGF	RAISGF RAIS F RAISEF	betanidina 6-O-glucosiltransferase (*Amaranthus tricolor*), transportador betaina/prolina (*Amaranthus tricolor*), NADH-plastoquinona oxidoredutase subunidade 1 (*Amaranthus tricolor)*
PTSNM	TSNM	LEA (*Amaranthus hybridus subs. cruentus*)

Quadro 6. Sequência peptídica do permeato celualar da porção basolateral após 2h de exposição, peptídeos similares e proteínas da família *Amaranthacea*.

Sequência peptídica observada na porção basolateral	Peptídeos similares localizados BLAST	Fragmento proteico e espécie BLAST
LFNSQ	LFNS, LFNSQ , LF SQ LFSSQ	NADH-plastoquinona oxidoreductase subunidade 4 (*Amaranthus tricolor)*, citocromo P450 proteína 76AD1, parcial *(Amaranthus hybridus* subsp. *cruentus)*
DTDAF	TDAF	acetolactato sintase (*Amaranthus tuberculatus*), (*Amaranthus hypochondriacus*), (*Amaranthus retroflexus*), (*Amaranthus hybridus*)

Importante ressaltar que todos os peptídeos analisados possuíram correspondência com o amaranto, e que a maioria são sequências presentes em globulinas 11S. A globulina 11S ou amarantina é responsável por muitos efeitos bioativos (ROMERO-ZEPEDA e PAREDES-LOPEZ, 1995; TOVAR-PÉREZ *et al.*, 2009).

Observa-se uma diferença entre as sequências peptídicas do hidrolisado proteico de amaranto antes da permeação e o conteúdo de hidrolisados na porção apical e basolateral celular. Isto pode ser explicado pela presença de peptidases de membrana no epitélio de células Caco-2 (DING *et al*., 2015). A literatura demonstra que apenas alguns fragmentos de di- e tripeptídeos podem ultrapassar a barreira intestinal, entretanto alguns estudos expõem a possibilidade de permeação celular por fragmentos maiores (PICARIELLO *et al.*, 2013). Este transporte dá-se pela via paracelular, de forma passiva. O relaxamento de "*tight junctions*" é influenciado por diversos fatores, por exemplo, enzimas, neuropeptídios, neurotransmissores, citocinas pró inflamatórias, radicais livres e peptídeos hidrofóbicos (LERNER e MATTHIAS, 2015).

A fim de verificar os efeitos dos peptídeos bioativos observados nos permeatos de células Caco-2, tanto na porção apical quanto na porção basolateral, as sequências foram inseridas na base de dados BIOPEP (http://www.uwm.edu.pl/biochemia). As Tabelas 4, 5, 6, 7, 8 e 9 mostram os efeitos biológicos destes peptídeos.

Tabela 4. Efeito bioativo da sequência proteica DVFNPQGGR

Nome do peptídeo	Atividade	Sequência	Locação
inibidor de ECA	inibidor de ECA	VF	[2-3]
inibidor de ECA	inibidor de ECA	GR	[8-9]
inibidor de ECA	inibidor de ECA	GG	[7-8]
inibidor de ECA	inibidor de ECA	QG	[6-7]
inibidor de ECA	inibidor de ECA	PQ	[5-6]
inibidor de dipeptidil peptidase IV (inibidor DPP IV)	inibidor de DPP IV	NP	[4-5]
inibidor de dipeptidil peptidase IV (inibidor DPP IV)	inibidor de DPP IV	FN	[3-4]
inibidor de dipeptidil peptidase IV (inibidor DPP IV)	inibidor de DPP IV	GG	[7-8]
inibidor de dipeptidil peptidase IV (inibidor DPP IV)	inibidor de DPP IV	PQ	[5-6]
inibidor de dipeptidil peptidase IV (inibidor DPP IV)	inibidor de DPP IV	QG	[6-7]
inibidor de dipeptidil peptidase IV (inibidor DPP IV)	inibidor de DPP IV	VF	[2-3]

Tabela 5. Efeito bioativo da sequência proteica FVVLK

Nome do peptídeo	Atividade	Sequência	Locação
peptídeo estimulante de captação de glicose	Estimulante	VL	[3-4]
peptídeo antioxidante	Antioxidante	LK	[4-5]
inibidor de dipeptidil peptidase IV (inibidor DPP IV)	inibidor de DPP IV	VV	[2-3]
inibidor de dipeptidil peptidase IV (inibidor DPP IV)	inibidor de DPP IV	VL	[3-4]

Tabela 6. Efeito bioativo da sequência proteica RAISGF

Nome do peptídeo	Atividade	Sequência	Locação
inibidor de ECA	inibidor de ECA	RA	[1-2]
inibidor de ECA	inibidor de ECA	GF	[5-6]
inibidor de ECA	inibidor de ECA	SG	[4-5]
inibidor de ECA	inibidor de ECA	AI	[2-3]
_____	ativador de proteólise mediada por ubiquitina	RA	[1-2]
inibidor de dipeptidil peptidase IV (inibidor DPP IV)	inibidor de DPP IV	RA	[1-2]
inibidor de dipeptidil peptidase IV (inibidor DPP IV)	inibidor de DPP IV	GF	[5-6]

Tabela 7. Efeito bioativo da sequência proteica PTSNM

Nome do peptídeo	Atividade	Sequência	Locação
inibidor de ECA	inibidor de ECA	PT	[1-2]
inibidor de dipeptidil peptidase IV (inibidor DPP IV)	inibidor de DPP IV	NM	[4-5]
inibidor de dipeptidil peptidase IV (inibidor DPP IV)	inibidor de DPP IV	PT	[1-2]
inibidor de dipeptidil peptidase IV (inibidor DPP IV)	inibidor de DPP IV	TS	[2-3]

Tabela 8. Efeito bioativo da sequência proteicaLFNSQ

Nome do peptídeo	Atividade	Sequência	Locação
inibidor de dipeptidil peptidase IV (inibidor DPP IV)	inibidor de DPP IV	FN	[2-3]

Tabela 9. Efeito bioativo da sequência proteicaDTDAF

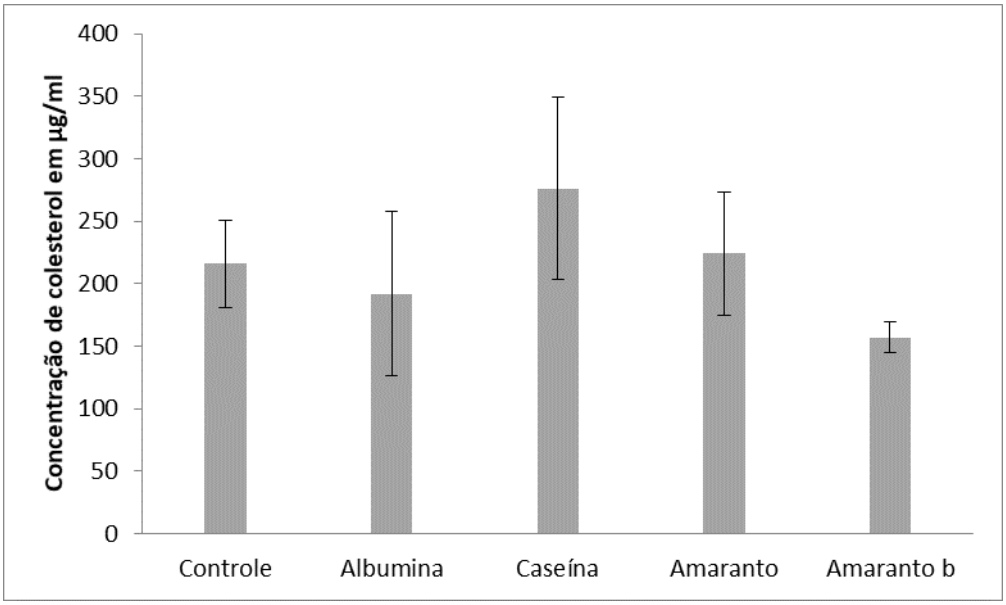
Nome do peptídeo	Atividade	Sequência	Locação
inibidor de ECA	inibidor de ECA	AF	[4-5]
inibidor de ECA	inibidor de ECA	DA	[3-4]
inibidor de dipeptidil peptidase IV (inibidor DPP IV)	inibidor de DPP IV	AF	[4-5]
inibidor de dipeptidil peptidase IV (inibidor DPP IV)	inibidor de DPP IV	TD	[2-3]

Os peptídeos bioativos são inativos enquanto pertencem à sua proteína de origem. Após digestão enzimática ou outro processamento do alimento, estes peptídeos podem atuar como moduladores metabólicos. Muitas dessas sequências estão relatadas na literatura como inibidores da atividade da ECA (enzima conversora de angiotensina) e DPP IV, efeitos anti-hipertensivo e no metabolismo de glicose, respectivamente (MONTOYA-RODRÍGUES *et al*., 2015).

5.2.3. Análise do efeito do isolado proteico na permeação de colesterol em células Caco-2

Ao avaliar o efeito dos hidrolisados, em doses de 3 mg/mL de albumina, caseína e amaranto, e 1 mg/mL de amaranto na permeação de colesterol, por meio de solubilização micelar, foi observado que não houve diferença ($p = 0,05$) entre as amostras na porção basolateral. Entretanto, observa-se uma tendência em diminuir a absorção de colesterol para o isolado proteico de amaranto hidrolisado, na dose de 1mg/mL (amaranto b) (Figura 4). Já na porção apical, as concentrações de colesterol após 2 h de permeação foram semelhantes, exceto para o amaranto b, mas sem diferença estatística (Figura 5).

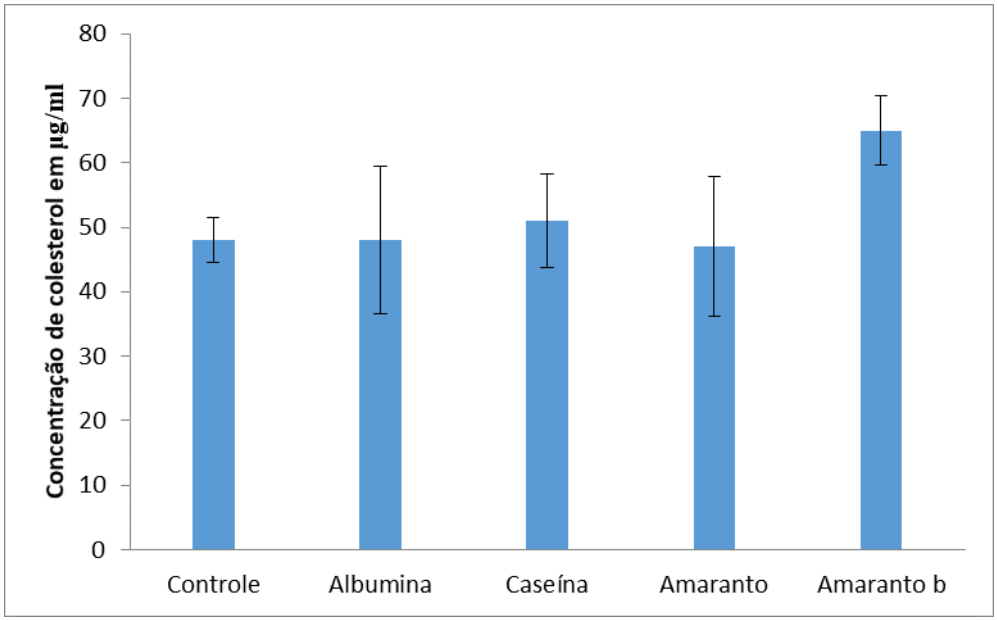
Figura 4. Concentração de colesterol em permeato basolateral após 2h de exposição de hidrolisados proteicos.



Comparação sem diferença estatística, p = 0,05.

n=6 para todos os grupos.

Figura 5. Concentração de colesterol em permeato apical após 2h de exposição de hidrolisados proteicos.



Comparação sem diferença estatística, p > 0,05.

n=6 para todos os grupos.

As concentrações de colesterol na porção apical foram: 48 µg/mL para o controle (micelas de colesterol), 48 µg/mL para albumina, 51 µg/mL para a caseína, 47 µg/mL para o amaranto e 65 µg/mL para o amaranto b (concentração 1mg/mL).

As concentrações de colesterol na porção basolateral foram: 216 µg/mL para o controle (micelas de colesterol), 192 µg/mL para albumina, 276 µg/mL para a caseína, 224 µg/mL para o amaranto e 157 µg/mL para o amaranto b (concentração 1mg/mL). Observa-se uma diminuição de captação de colesterol em 27%, quando comparado a menor concentração de hidrolisado proteico de amaranto ao controle. A maior concentração, em meio basolateral, de colesterol relacionada ao hidrolisado proteico de amaranto, na dose de 3 mg/mL, pode ser explicada como um mecanismo de auto regulação celular. A menor disponibilidade de colesterol em solução micelar pode favorecer maior absorção por difusão passiva. Em trabalhos anteriores, o hidrolisado proteico de amaranto, nesta mesma concentração, inibiu a solubilização micelar de colesterol em 44%, em ensaio "*in vitro*" (CARLOS-MENEZES, 2013).

A permeação de colesterol na presença de caseína parece ser facilitada devido à maior presença e relação de lisina e arginina (CARROLL e KUROWSKA, 1995). A hipercolesterolemia mediada pela caseína pode ser atribuída a mecanismos gastrointestinais, como mudanças na absorção e excreção de esterois e ácidos biliares (PFEUFFER, 1989).

Por outro lado, há um crescente número de evidências acerca de proteínas vegetais e animais influenciarem a incorporação de colesterol dentro das micelas (MATSUOKA *et al*., 2008; LIMPEANCHOB *et al*., 2010; NAGAOKA *et al*., 2010). Todavia, ensaios celulares podem demonstrar resultados inconclusivos, devido à variabilidade celular. RADTKE *et al*. (2014) compararam o efeito de ezetimiba (0,04 mg/mL), albumina (5 mg/mL), conglutina γ derivada de tremoço (0,6 mg/mL) e

fitato de sódio (0,18 mg/mL) na captação de radioisótopo de colesterol por células Caco- 2. A ezetimiba e o fitato reduziram a captação em 21%, aproximadamente, já a albumina e a proteína de tremoço não exibiram diferença estatística em relação ao controle.

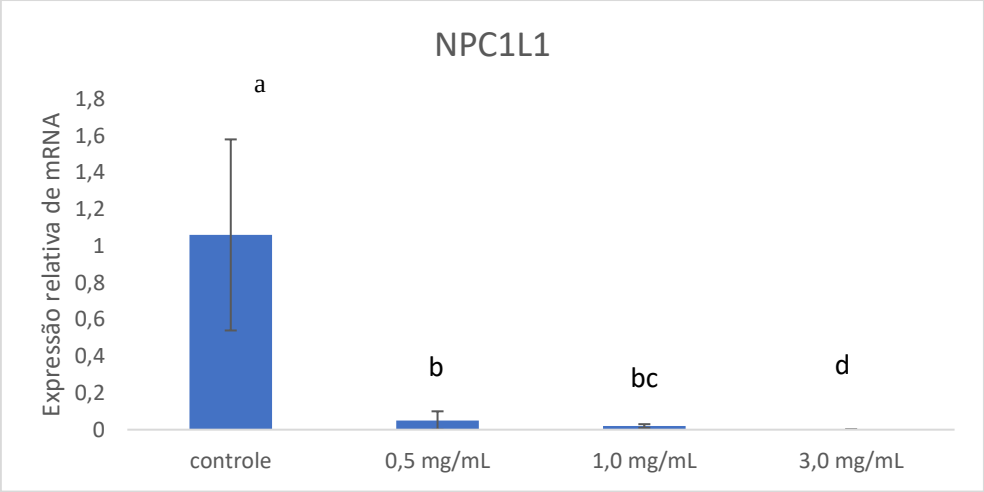
Há evidência de que isolados proteicos e fosfolípides possam apresentar efeitos sinérgicos ou antagônicos na estabilidade de emulsões. As interações entre eles podem conduzir mudanças na atividade de superfície, modificações e incorporação da proteína na estrutura de micelas e vesículas (SCURIATTI *et al*., 2003).

5.2.4. Efeito de exposição crônica do hidrolisado proteico em células Caco-2

A expressão gênica do mRNA de *NPC1L1, ABCA1, ABCG1, HMGR, AMPK* e *SREBP2* após a exposição ao hidrolisado proteico de amaranto nos tempos 2h e 12h estão expressos nas figuras a seguir. Não foi possível comparar a dose de 3 mg/mL na exposição de 12 h, devido à ausência de média para análise.

A Figura 6 demonstra uma diminuição crescente da expressão gênica do transportador NPC1L1, com diferença estatística na dose de 3 mg/mL, no tempo de 2 h. Já no tempo de exposição aumentada, conforme Figura 7, a expressão de NPC1L1 diminuiu em aproximadamente 50%, quando se dobrou a dose de hidrolisado proteico de amaranto. Contudo, só houve diferença na exposição entre os tempos de 2h e 12h na dose de 0,5 mg/mL (Figura 8).

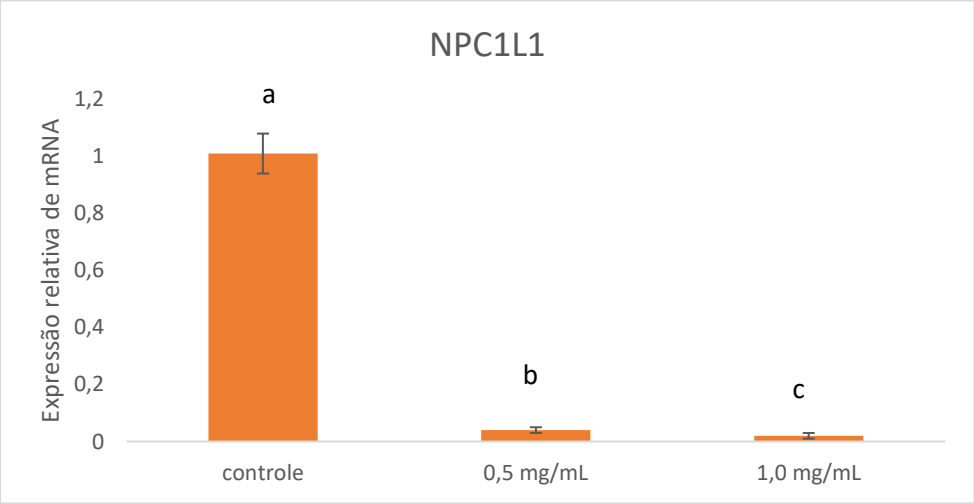
Figura 6. Efeito da exposição de 2h do hidrolisado proteico na expressão gênica do transportador NPC1L1 ($p < 0,02$)



Letras diferentes expressam diferença estatística $p < 0,02$

n=3 para todos os grupos.

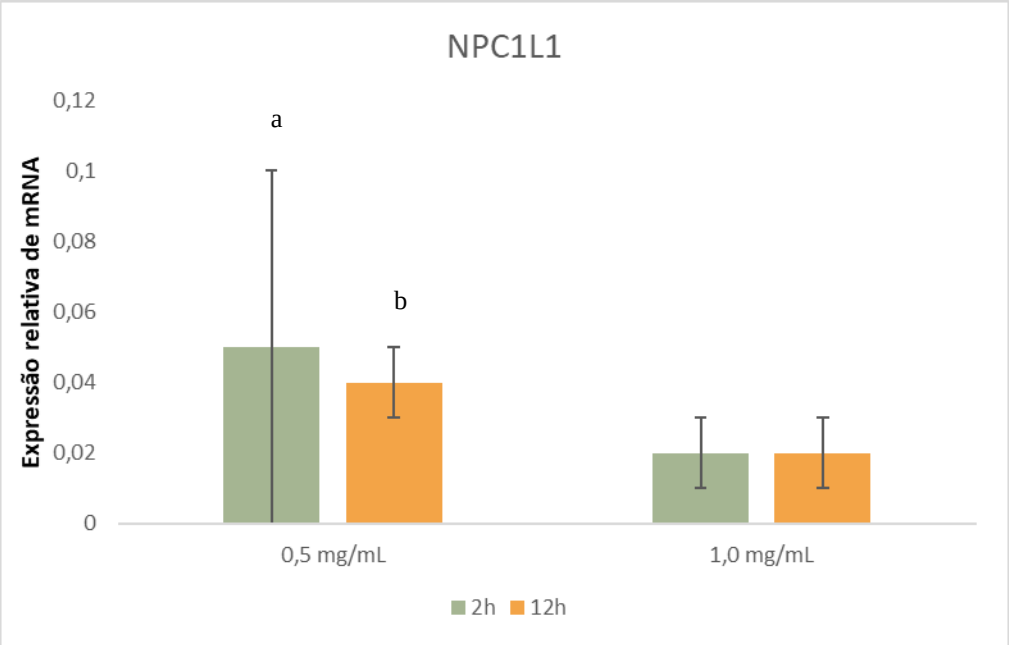
Figura 7. Efeito da exposição de 12h do hidrolisado proteico na expressão gênica do transportador NPC1L1 ($p <0,04$)



Letras diferentes expressam diferença estatística: $p <0,04$

n=3 para todos os grupos.

Figura 8. Efeito comparativo de doses e tempos distintos do hidrolisado proteico na expressão gênica do transportador NPC1L1.



Diferença estatística na comparação de 0,5 mg/ml em 2 h, p <0,03

n=3 para todos os grupos.

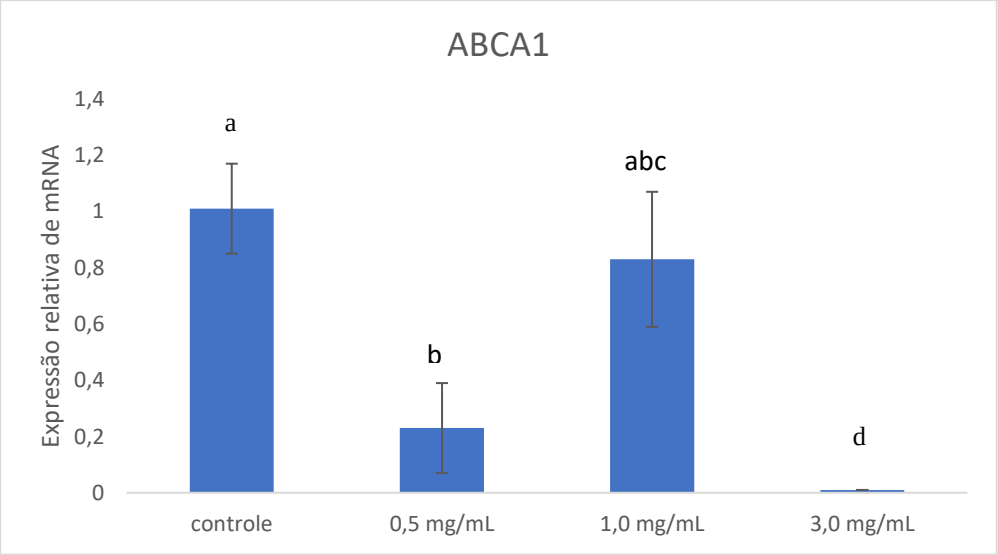
Estes resultados complementam os dados obtidos na permeação de colesterol, durante a incubação com o hidrolisado proteico de amaranto em ambas as doses. Os segmentos de peptídeos contendo aminoácidos hidrofóbicos competem na interação do colesterol nas micelas mistas, ao se ligarem aos sais biliares. As maiores doses destes segmentos (3 mg/mL) tendem a deixar o colesterol menos disponível para absorção intestinal. O excesso de colesterol não solubilizado pode ser internalizado por difusão passiva, a grande quantidade no meio celular pode favorecer uma diminuição na expressão gênica do receptor NPC1L1, mecanismo de regulação fisiológica com finalidade em reduzir a internalização desta substância na célula intestinal. Todavia, o tempo de exposição parece não influenciar na expressão deste receptor.

O NPC1L1 é um transportador responsável pela captação de colesterol no lúmen intestinal. Em humanos, é expresso no intestino delgado e no fígado, e sua alteração de expressão vem sendo alvo de drogas e estudos com foco na diminuição de níveis de LDL- c. Mutações inativadoras do gene NPC1L1 estão associados à redução da absorção de colesterol. Indivíduos portadores de um nulo heterozigótico mostram uma diminuição modesta no LDL-c, em média apenas 0,31 mmol/L, mas uma diminuição do risco de DCV em 54%, que delineia a forte relação entre os níveis plasmáticos de LDL-c e o risco da doença (BOER et al., 2018). Em estudos realizados em cultura de hepatoma celular foi demonstrado que o NPC1L1 pode estar localizado tanto na membrana celular quanto no compartimento endocítico de reciclagem, no interior da célula, sendo regulado pela disponibilidade de colesterol no meio citoplasmático. Quando o colesterol é depletado, em culturas celulares com ciclodextran, NPC1L1 é translocado para a membrana plasmática apical a fim de normalizar o conteúdo interno de colesterol. Também é regulado por SREBP-2 (MUKHERJIE *et al*., 1998; YU *et al*., 2006; BETTERS e YU *et al*., 2010).

O transportador ABCA1 também desempenha um papel importante na homeostase de colesterol, mas atuando no efluxo desta substância. Representa o primeiro fator de controle no transporte reverso de colesterol (ORAM e LAWN, 2011). Pode-se observar que a incubação das células com o isolado proteico, na dose de 3 mg/mL durante 2 horas, diminuiu significativamente a expressão gênica do transportador ABCA1 (Figura 9). Já no período de exposição de 12 h, houve uma redução da expressão quando comparada ao controle, mas entre as doses de 0,5 e 1 mg/mL não houve diferença (Figura 10). Entretanto, quando comparado as concentrações em função dos tempos de exposição, observa-se, na Figura 11, uma diminuição na expressão gênica na dose de 1mg/mL, no tempo de 12h.

A diminuição da expressão gênica deste transportador na presença de hidrolisado de amaranto demonstra uma resposta frente à redução de colesterol intracelular. Porém, observa-se que a concentração do hidrolisado interfere fortemente na modulação deste transportador, quando comparado ao tempo de exposição. A atividade de ABCA1 é determinante para os níveis plasmáticos de HDL. Estudos em pacientes com doença de *Tangier* e ensaios com modelos animais indicam que mutações com perda de função do transportador conduzem um impacto negativo no metabolismo de lipoproteínas, com rápido catabolismo de apo-A1 e acúmulo de esteróis em macrófagos, células intestinais e hepatócitos, por exemplo (ORAM e LAWN, 2011).

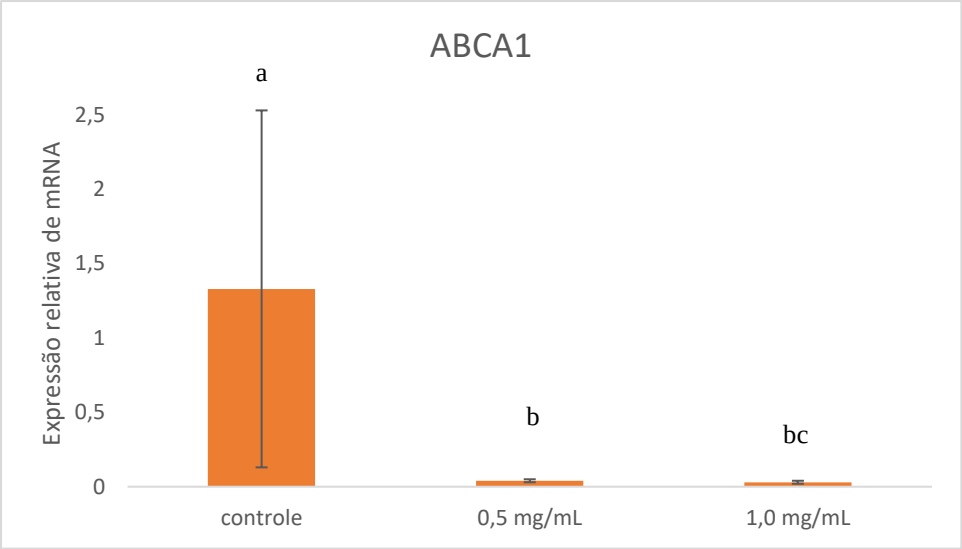
Figura 9. Efeito da exposição de 2h do hidrolisado proteico na expressão gênica do transportador ABCA1. (p <0,03)



Letras diferentes expressam diferença estatística: p <0,03

n=3 para todos os grupos.

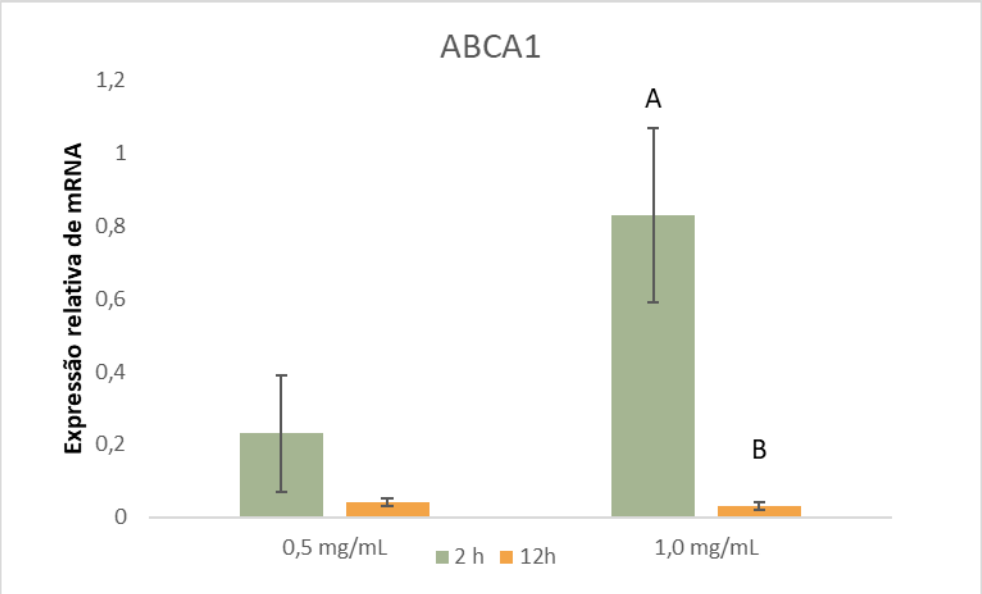
Figura 10. Efeito da exposição de 12h do hidrolisado proteico na expressão gênica do transportador ABCA1. (p< 0,05)



p< 0,05, sem diferença estatística

n=3 para todos os grupos.

Figura 11. Efeito comparativo entre dose e tempo de exposição do hidrolisado proteico na expressão gênica do transportador ABCA1.



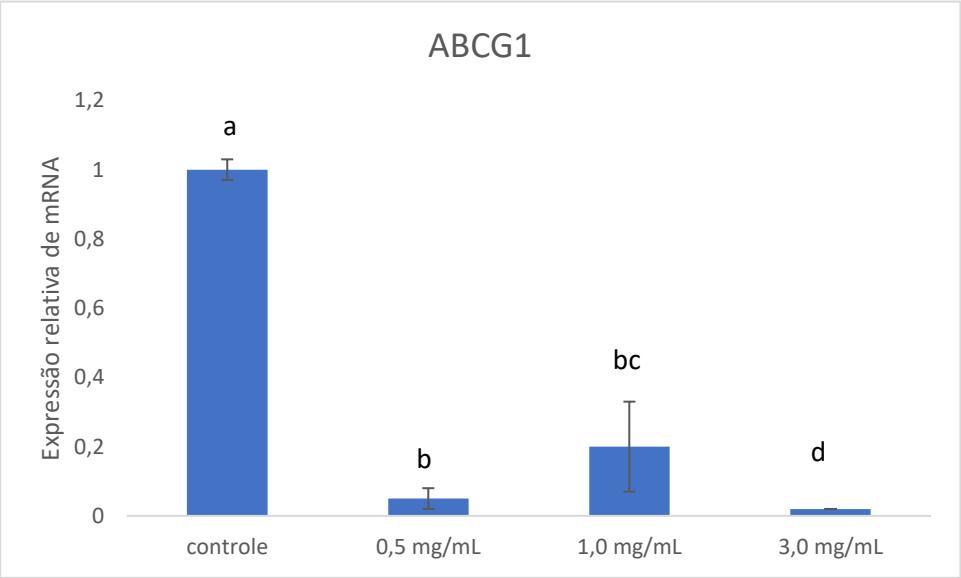
Letras "A" e "B" expressam diferença estatística, p < 0,00

Comparação entre a concentração de 1,0 mg/ml, nos tempos de 2h e 12h.

n=3 para todos os grupos.

O hidrolisado proteico de amaranto também demonstra efeitos sobre a expressão gênica de ABCG1. Observa-se uma diminuiçãoda expressão gênica comparado ao controle, e uma tendência de redução à medida que se aumenta a dose do hidrolisado, independente do tempo de exposição (Figuras 12, 13 e 14). ABCG1 também desempenha um papel importante no efluxo de colesterol das células para maturar as partículas de HDL. Os níveis de ABCA1 e ABCG1 são aumentados pela ativação de LXR. LXR é um fator de transcrição de hormônio nuclear que é ativado por oxiesteróis. Os níveis de colesterol em uma célula aumentam a formação de oxiesteróis, conduzindo à ativação de LXR, e por consequência em um aumento na expressão de ABCA1 e ABCG1, o que resultará no aumento do efluxo de colesterol da célula para HDL. Além disso, os mRNAs ABCA1 e ABCG1 são direcionados para a degradação pelo miR-33, um microRNA que está incorporado no gene SREBP2 (FEINGOLD e GRUNFELD, 2015).

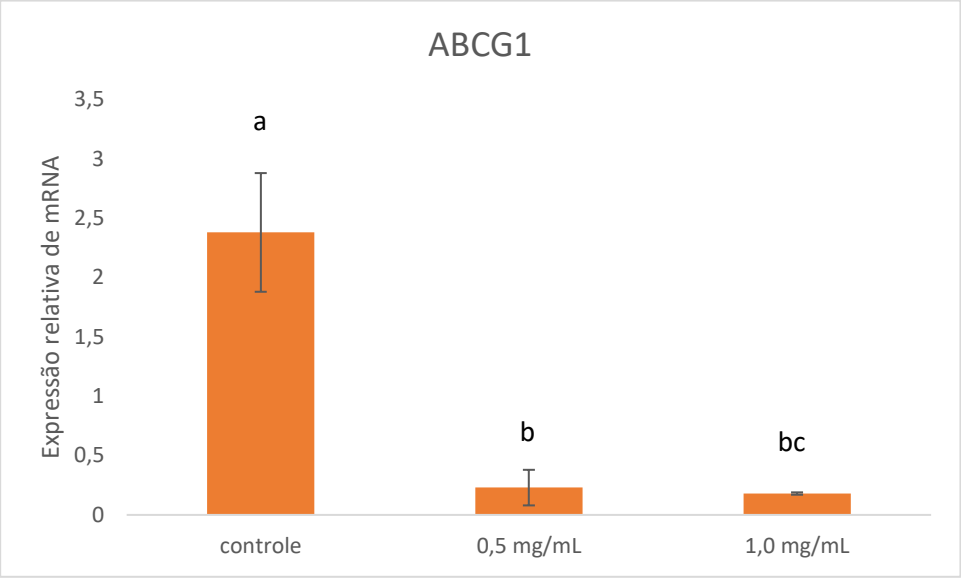
Figura 12. Efeito da exposição de 2h do hidrolisado proteico na expressão gênica do transportador ABCG1



Letras diferentes expressam diferença estatística: p <0,03

n=3 para todos os grupos.

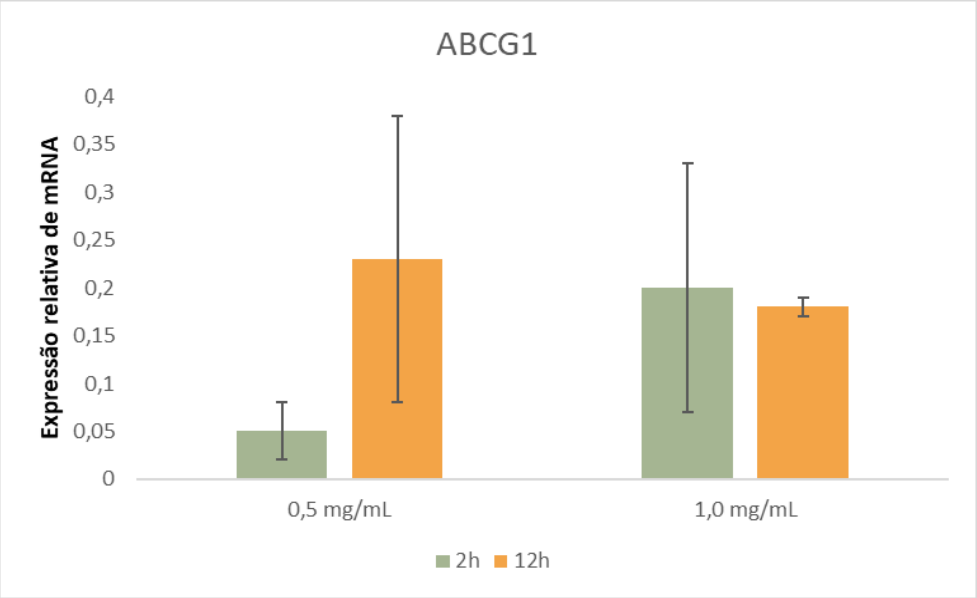
Figura 13. Efeito da exposição de 12h do hidrolisado proteico na expressão gênica do transportador ABCG1 ($p < 0,05$)



Letras diferentes expressam diferença estatística, $p < 0,05$

n=3 para todos os grupos.

Figura 14. Efeito comparativo entre dose e tempo de exposição do hidrolisado proteico na expressão gênica do transportador ABCG1



Comparação sem diferença estatística, $p > 0,05$.

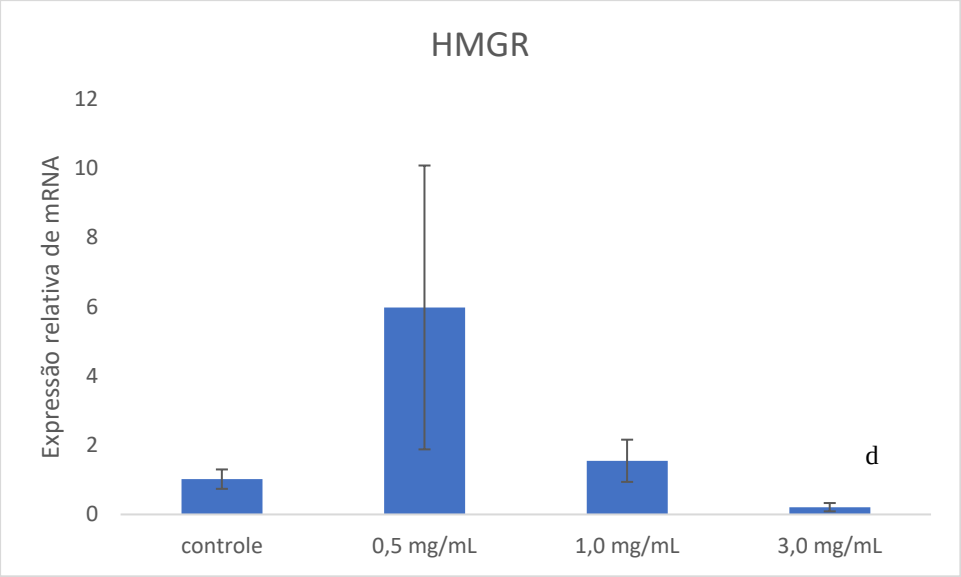
n=3 para todos os grupos.

A Figura 15 demonstra uma inibição da expressão gênica da enzima HMGR, quando as células Caco-2 foram expostas por duas horas ao hidrolisado proteico de

amaranto na dose de 3 mg/mL. Também houve uma redução considerável da expressão da enzima, quando as células foram expostas por 12 h, tanto na menor concentração quanto na dose de 1 mg/mL (Figura 16). No comparativo dentro do maior tempo, não houve diferença entre as doses, somente quando comparadas ao controle (Figura 17).

Embora, o colesterol possa ser obtido via consumo alimentar, a maioria deste composto é sintetizado endogenamente. A enzima HMGR catalisa um passo limitante na via do mevalonato que conduz a biossíntese de colesterol. Portanto, a inibição da atividade enzimática é importante na redução dos níveis de colesterol endógeno durante a hipercolesterolemia (BOACHIE *et al*., 2018). As estatinas são inibidores competitivos que interagem com sítios de ligação da HMGR por dividirem uma porção de molécula que se assemelham entre si, evitando que o substrato se ligue à enzima por mecanismo estérico. De acordo com pesquisa prévia do grupo (SOARES *et al.*, 2015), há indícios de que os peptídeos encriptados no amaranto se ligam a sítios desta enzima, representando uma classe de inibidores de HGMR, cuja ação se assemelha às estatinas.

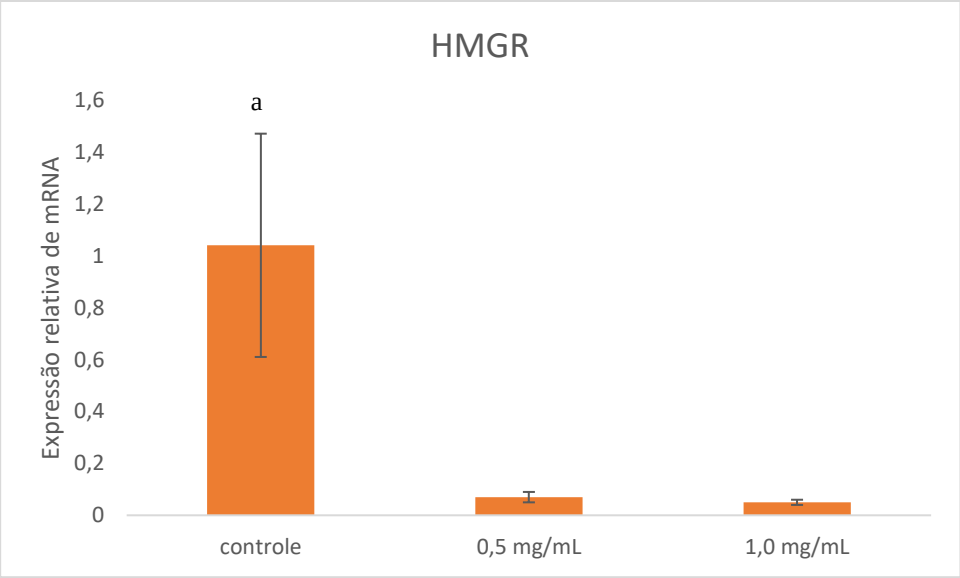
Figura 15. Efeito da exposição de 2h do hidrolisado proteico na expressão gênica da enzima HMGR ($p < 0,04$).



Letra "d" expressa diferença estatística: $p < 0,04$

n=3 para todos os grupos.

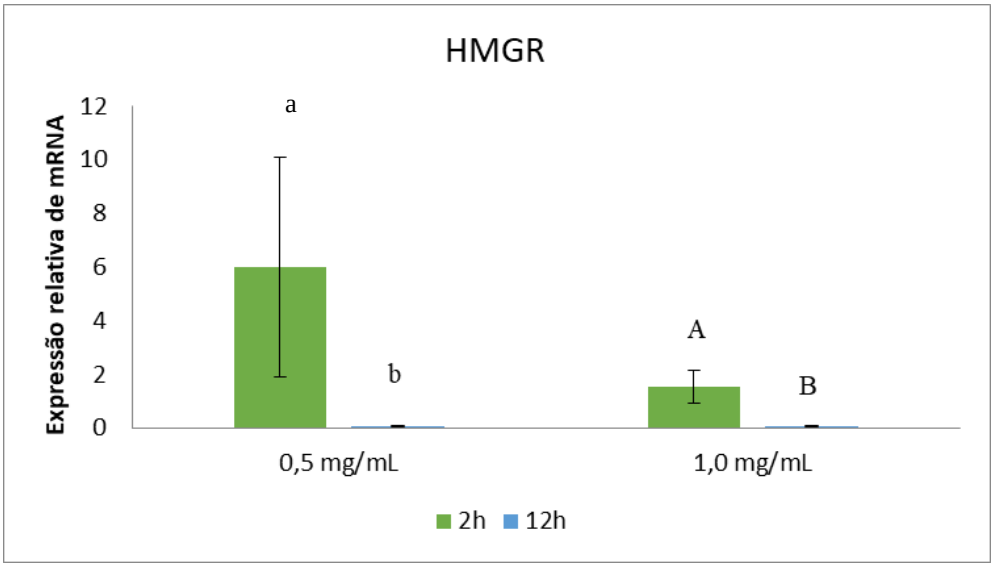
Figura 16. Efeito da exposição de 12h do hidrolisado proteico na expressão gênica da enzima HMGR ($p < 0,05$).



Letra "a" expressa diferença estatística, $p < 0,05$

n=3 para todos os grupos.

Figura 17. Efeito comparativo entre dose e tempo de exposição do hidrolisado proteico na expressão gênica da enzima HMGR



Letras "a" e "b" expressam diferença estatística, $p < 0,00$, comparação entre os tempos 2h e 12h na concentração de 0,5 mg/ml.

Letras "A" e "B" expressam diferença estatística, $p < 0,001$, comparação entre os tempos 2h e 12h na concentração de 1 mg/ml.

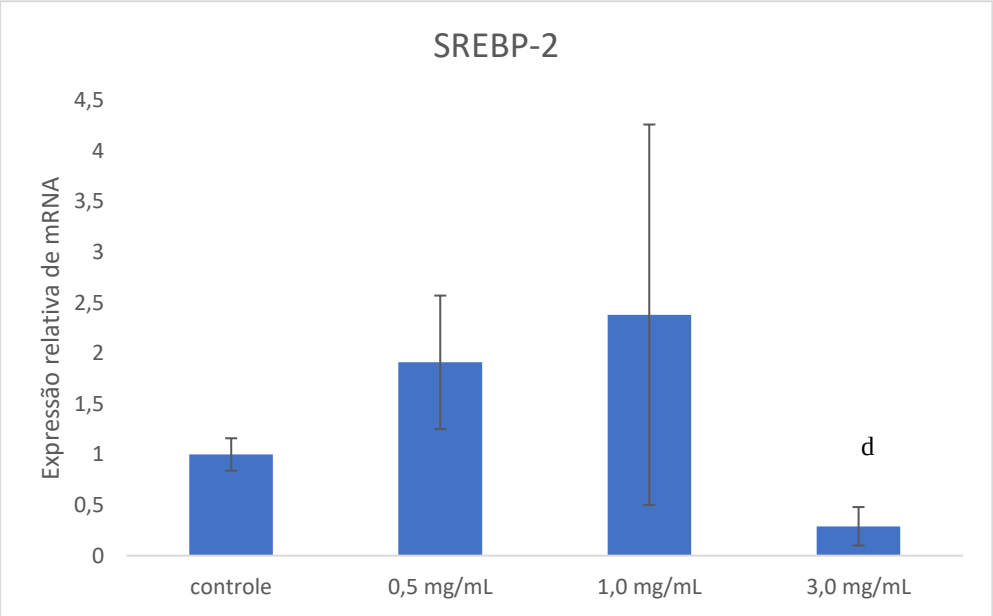
n=3 para todos os grupos.

Peptídeos bioativos também podem influenciar a expressão de ativadores transcricionais de genes envolvidos no transporte e metabolismo de colesterol. SREBP-2 é um fator transcricional do metabolismo lipídico e do controle na expressão de genes envolvidos na homeostase de colesterol, incluindo LDLr, PCSK9 e HMGR (BROWN e GOLDSTEIN, 1997; BOACHIE *et al*., 2018). SREBP-2, na sua forma inativa, permanece ancorado à membrana do retículo endoplasmático e é ativado por clivagem proteolítica, liberando assim o domínio N-terminal, o qual interage com o fator de transcrição bHLH – ZIP, que o transloca para o núcleo para atuar na regulação da expressão gênica (BOACHIE *et al*., 2018).

A Figura 18 mostra uma redução significativa da expressão gênica de SREBP-2, na dose de 3 mg/mL, em 2 horas de exposição. Quando há a comparação do tempo de exposição, observa-se que em 12 h há uma redução ainda maior da expressão gênica,

em torno de 0,001 unidade de expressão relativa de mRNA, para ambas as doses: 0,5 e 1,0 mg/mL de hidrolisado proteico, quando comparado a expressão do controle: 1,11 em unidade de expressão relativa de mRNA (Figura 19). Sendo o tempo de exposição, o maior determinante na redução da expressão quando comparado às diferentes concentrações no mesmo período.

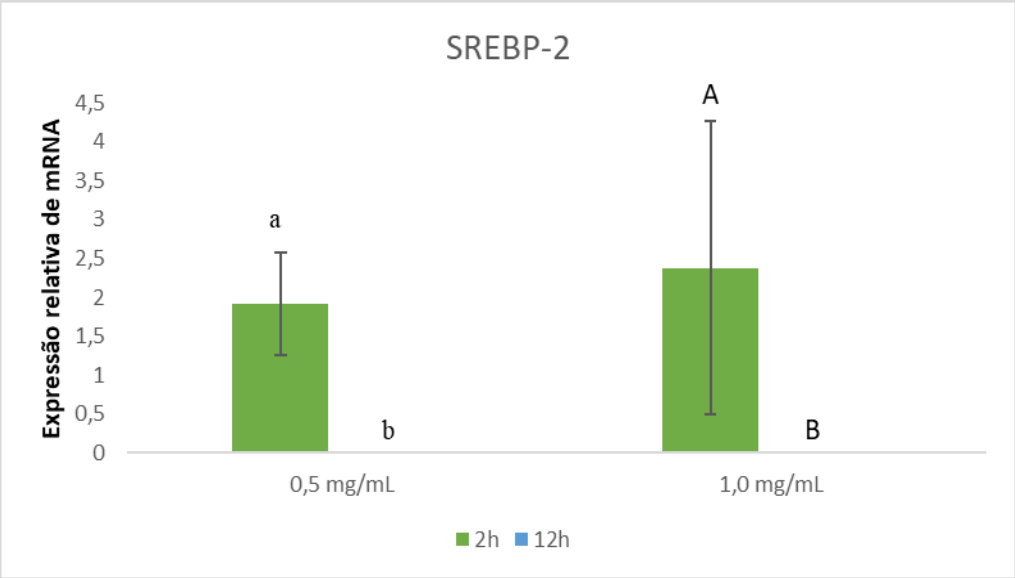
Figura 18. Efeito da exposição de 2h do hidrolisado proteico na expressão gênica do fator nuclear SREBP-2



letra "d" expressa diferença estatística: $p < 0,002$

n=3 para todos os grupos.

Figura 19. Efeito comparativo entre dose e tempo de exposição do hidrolisadoproteico na expressão gênica do fator nuclear SREBP-2



Letras "a" e "b" expressam diferença estatística, p < 0,000, comparação entre os tempos 2h e 12h na concentração de 0,5 mg/ml.

Letras "A" e "B" expressam diferença estatística, p < 0,000, comparação entre os tempos 2h e 12h na concentração de 1 mg/ml.

n=3 para todos os grupos.

MARQUES *et al*. (2018) avaliaram o efeito do peptídeo derivado de feijão caupi (MELNAVSVVHS) sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo de colesterol, em células HepG2. Os resultados demonstraram diminuição da expressão gênica de SREBP-2, HMGR e LDLr. Em contrapartida, LAMMI *et al.* (2014) observaram que houve um aumento dos níveis proteicos de SREBP-2 e LDLr quando células HepG2 foram expostas à peptídeos de tremoço. Os peptídeos derivados de amaranto e de feijão caupi tendem a promover hipocolesterolemia por modulação primária de fatores de transcrição, reduzindo a síntese e captação de colesterol pelas células. De forma alternativa, os peptídeos de tremoço tendem a promover a hipocolesterolemia aumentando a internalização de colesterol pelos tecidos.

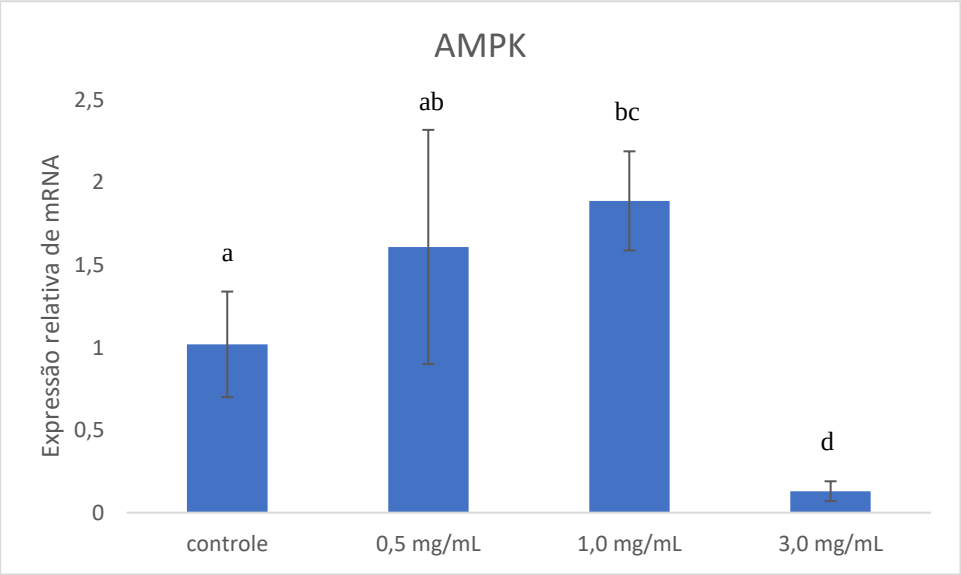
A AMPK é um regulador central da homeostase energética, que coordena as vias metabólicas e, assim, balanceia o suprimento de nutrientes com a demanda de energia.

Como um sensor de energia celular, AMPK é ativada em resposta a uma variedade de condições tais como: restrição de nutrientes (especialmente glicose), hipóxia, exposição a toxinas que inibem o complexo da cadeia respiratória mitocondrial e atua na síntese de ácidos graxos (KIM *et al*., 2016).

Recentemente, foi relatado que a ativação de AMPK, isoforma β 1, em macrófagos diminuiu a síntese de ácidos graxos e esterois, com o aumento do efluxo de colesterol celular, que está associado ao aumento da expressão gênica dos transportadores ABCA1 e ABCG1 (FULLERTON *et al*., 2015; KE *et al*., 2018). Na Figura 20, observa-se uma tendência de aumento da expressão gênica na dose de 1 mg/mL, com posterior redução da expressão na dose de 3 mg/mL, no tempo de 2 horas. Esse resultado obtido reflete a influência de AMPK sobre os transportadores de efluxo, os quais demonstraram o mesmo comportamento de aumento da expressão, seguido de queda sob as mesmas condições de tempo e concentração de hidrolisado.

As Figuras 21 e 22 também demonstram diminuição da expressão de AMPK comparando concentrações distintas no tempo de 12h e concentrações iguais em tempos diferentes, respectivamente.

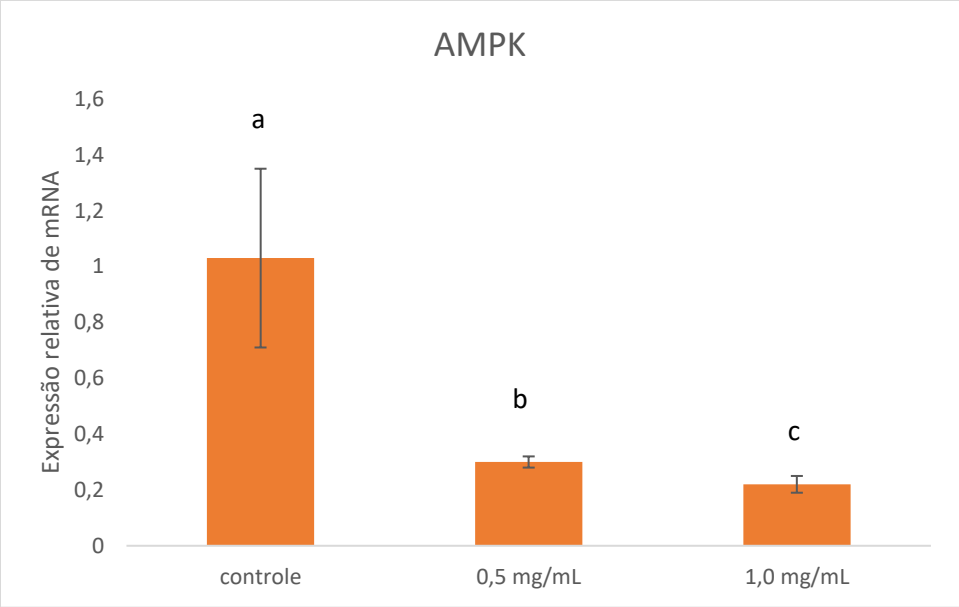
Figura 20. Efeito da exposição de 2h do hidrolisado proteico na expressão gênica de AMPK



Letrasdiferentes expressam diferença estatística, $p < 0,03$.

n=3 para todos os grupos.

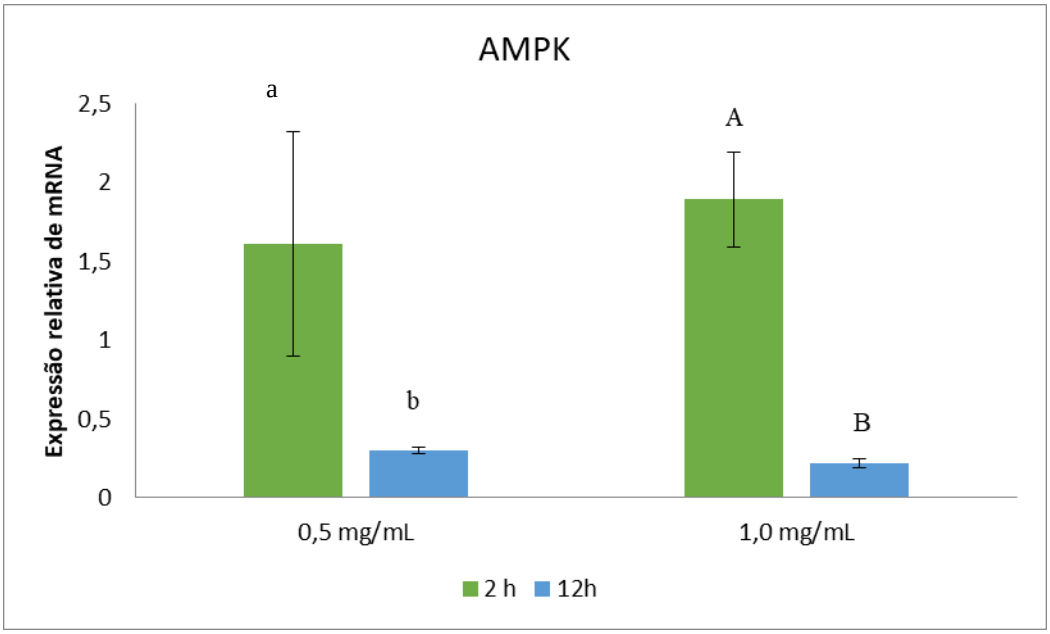
Figura 21. Efeito da exposição de 12h do hidrolisado proteico na expressão gênica de AMPK



Letras distintas expressam diferença estatística, $p < 0,02$.

n=3 para todos os grupos.

Figura 22. Efeito comparativo entre dose e tempo de exposição do hidrolisado proteico na expressão gênica do fator nuclear AMPK



Letras "a" e "b" expressam diferença estatística, $p < 0,03$, comparação entre os tempos 2h e 12h na concentração de 0,5 mg/ml.

Letras "A" e "B" expressam diferença estatística, $p < 0,00$, comparação entre os tempos 2h e 12h na concentração de 1 mg/ml.

n=3 para todos os grupos.

O hidrolisado proteico de amaranto, fração < 3 kDa, possui forte influência sobre a expressão gênica do fator de transcrição SREBP-2 e AMPK, sendo o primeiro o modulador da expressão gênica de HMGR e o segundo, o regulador da expressão gênica dos transportadores de efluxo ABCA1 e ABCG1.

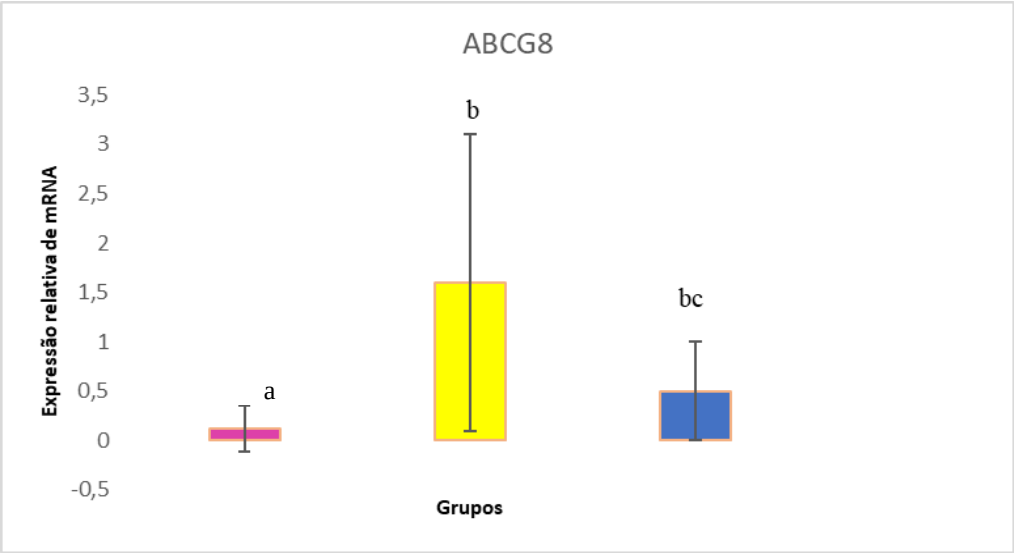
5.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NO TECIDO INTESTINAL DE HAMSTERS

Os resultados expressos nos tecidos intestinais de hamsters não foram tão positivos quanto os resultados obtidos a partir de células Caco-2, exceto para o transportador ABCG8. Nota-se na Figura 23, que o grupo I - rosa, o qual recebeu dieta

hipercolesterolêmica adicionada de isolado proteico de amaranto, teve uma diminuição na expressão do transportador ABCG8.

Os transportadores ABCG5 e ABCG8 formam um heterodímero obrigatório que limita a absorção intestinal e contribui para a secreção de colesterol e esterois vegetais dos hepatócitos para a bile (YU *et al*., 2014). Essa evidência confirma que a diminiuição da expressão gênica no intestino, reflete a diminuição da absorção intestinal e a menor disponibilidade de colesterol dentro dos enterócitos.

Figura 23. Expressão relativa de mRNA do gene *Abcg8* em função do grupo estudado.

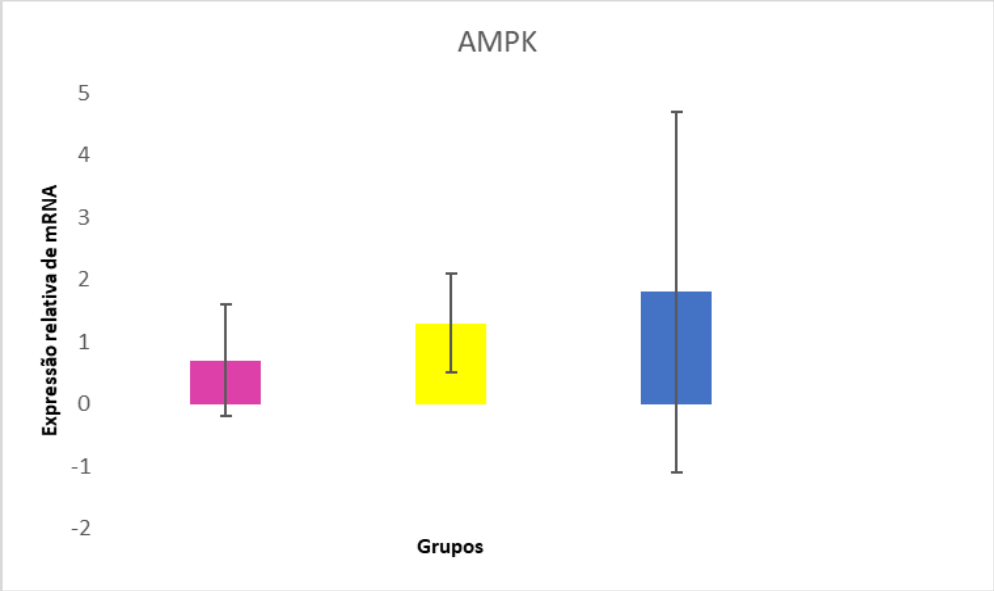


Letra" a" possui diferença estatística, p <0,03
n=8 para todos os grupos;
Grupo N (azul): dieta de acordo com AIN-93.
Grupo H (amarelo): dieta hipercolesterolemizante.
Grupo I (rosa): dieta hipercolesterolemizante com isolado proteico de amaranto.

Foi observada uma diminuição na expressão gênica de AMPKem células Caco-2. Pode-se demonstrar, pela Figura 24, que há uma tendência do isolado proteico de amaranto em reduzir a expressão desse gene em intestinos de hamsters. Entretanto, a

hetereogeneidade do grupo não permitiu tal observação, de forma estatisticamente diferente.

Figura 24. Expressão relativa de mRNA do gene AMPK em função do grupo estudado.



n=8 para todos os grupos; p>0,05.

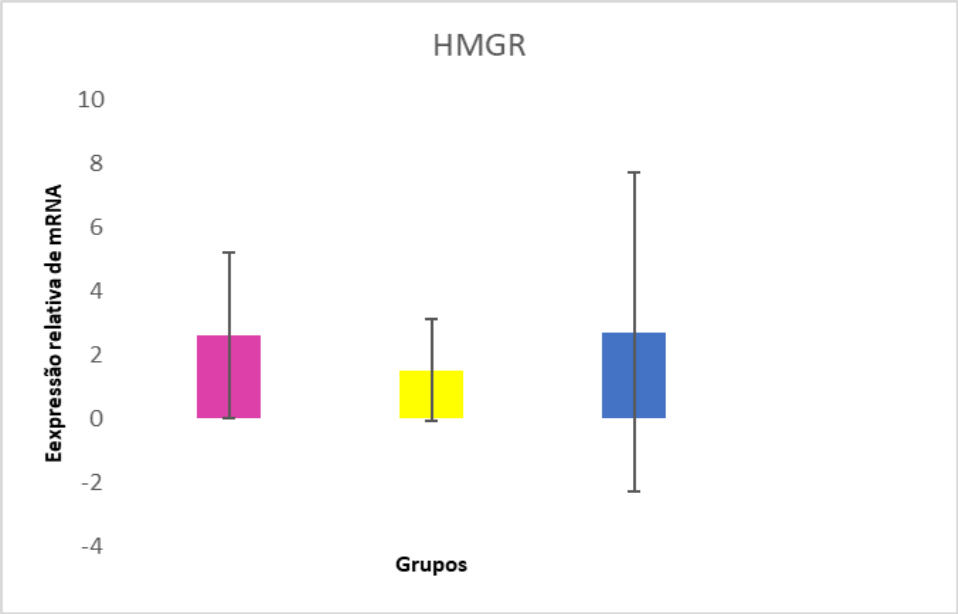
Grupo N (azul): dieta de acordo com AIN-93.

Grupo H (amarelo): dieta hipercolesterolemizante.

Grupo I (rosa): dieta hipercolesterolemizante com isolado proteico de amaranto.

A expressão gênica da enzima HMGR também não se alterou entre os grupos, embora haja uma tendência no aumento da expressão no grupo hipercolesterolêmico com o isolado proteico (rosa) em relação ao grupo hipercolesterolêmico (amarelo) (Figura 25). Contudo, observa-se o oposto na Figura 26, havendo uma tendência em diminuir a expressão gênica de SREBP-2 no grupo rosa.

Figura 25. Expressão relativa de mRNA do gene HMGR em função do grupo estudado.



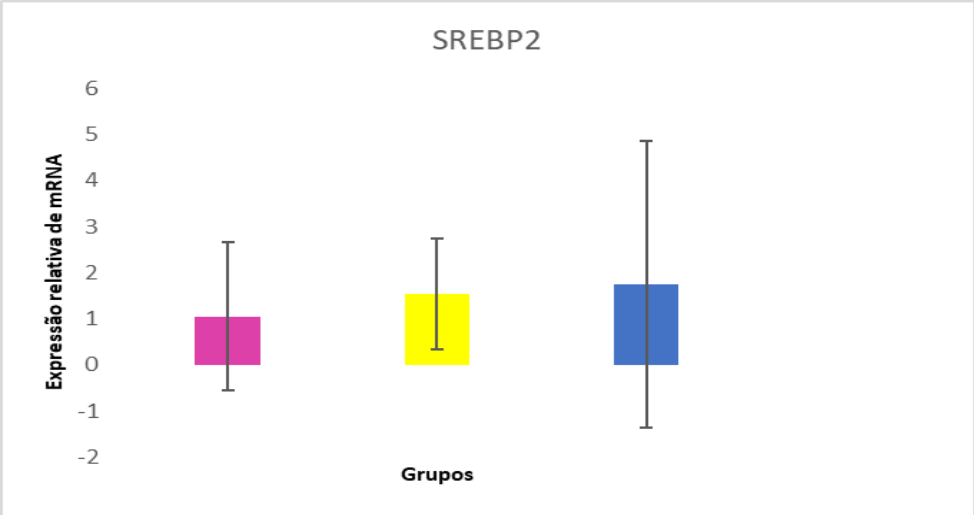
n=8 para todos os grupos; p>0,05.

Grupo N (azul): dieta de acordo com AIN-93.

Grupo H (amarelo): dieta hipercolesterolemizante.

Grupo I (rosa): dieta hipercolesterolemizante com isolado proteico de amaranto.

Figura 26. Expressão relativa de mRNA do gene SREBP2 em função do grupo estudado.



n=8 para todos os grupos; p>0,05.

Grupo N (azul): dieta de acordo com AIN-93.

Grupo H (amarelo): dieta hipercolesterolemizante.

Grupo I (rosa): dieta hipercolesterolemizante com isolado proteico de amaranto.

O SREBP2 é conhecido por regular a expressão de HMGR e outras principais proteínas envolvidas no enriquecimento do colesterol (SINGH *et al.*, 2013). No trabalho atual, houve uma tendência, não significativa, da expressão do SREBP2 ser maior no grupo azul quando comparada aos demais. Neste sentido, há corroboração da ideia de que com altas taxas de colesterol dietético ocorre inibição do SREBP2. Da mesma forma, pode ser notada uma tendência (não significativa) de maior expressão do gene HMGRno grupo azul em relação aos demais. Assim, verifica-se que a alteração na produção de mRNA do gene nem sempre está diretamente relacionada ao rendimento de sua atividade biológica. Por isso, é necessário aprofundamento e confirmação dos dados por meio de outros métodos, como medida de sua atividade e expressão proteica.

Embora não tenha havido alterações relevantes, em estudos prévios com estes animais, foi verificado que o isolado proteico de amaranto foi capaz de reduzir a hipercolesterolemia quando a dieta hipercolesterolemizante foi introduzida em paralelo ao isolado. Parâmetros lipídicos do sangue, das fezes e do fígado conduziram para uma redução do risco cardiovascular significativa em relação ao grupo hipercolesterolemizado. Também foi observada maior excreção de colesterol nas fezes (FREITAS, 2017).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O padrão alimentar deve ser resgatado por meio do incentivo à alimentação saudável, em conjunto com a orientação sobre a seleção dos alimentos, o modo de preparo, a quantidade e as possíveis substituições alimentares, em harmonia com a mudança do estilo de vida.

Cada vez mais, alimentos contendo amaranto vêm sendo formulados e comercializados no mercado nacional, devido aos estudos com o grão, que promovem disseminação do conhecimento sobre esse pseudocereal para os profissionais da saúde e população em geral. Seu consumo tem ocorrido na forma estourada ou de farinha termicamente processada, sendo esta comercializada como parte integrante de produtos de panificação de diversas empresas do setor alimentício.

Apesar de termos evidências suficientes de que a proteína do amaranto é capaz de reduzir o colesterol total e melhorar o perfil de VLDL+LDL, reduzindo a expressão gênica de transportadores, enzimas e fator de transcrição, ainda é necessária a elucidação de todos os mecanismos envolvidos.

Deve ser investigada ainda, em modelos celulares, em animais e em humanos, os mecanismos intestinais e hepáticos de controle de colesterol sob influência do hidrolisado proteico de amaranto, como: a expressão gênica e de proteínas de LDLr, expressão de transportadores ABCG5/G8e expressão de PCSK9 e ACAT.

Além disso, trabalhos futuros poderiam selecionar alguns peptídeos e utilizá-los em ensaios, de forma marcada.

7. CONCLUSÃO

Foram identificados fragmentos peptídicos provenientes da digestão *in vitro* do isolado proteico de amaranto. As 7 sequências principais apresentaram 90% de similaridade e cobertura em relação ao banco de dados analisado, majoritariamente pertencem as sequências da globulina 11 S do amaranto. Muitos destes peptídeos já estão descritos na literatura com função anti-hipertensiva, hipoglicêmica e anti-tumoral, mas não há descrição das sequências hipocolesterolêmicas.

Verificou-se que o hidrolisado proteico do amaranto foi capaz de reduzir a expressão gênica de transportadores NPC1L1 e ABCA1, limitando a absorção do colesterol. Embora, estes dados sejam contraditórios aos resultados de permeabilidade. Acredita-se, que a maior parte de colesterol que ultrapassou a membrana tenha sido por difusão passiva, embora não haja diferença estatística entre as concentrações e nem entre as amostras. A diminuição da expressão dos transportadores pode ter sido influenciada pela diminuição de AMPK e por meio de regulação de concentrações de colesterol citosólico. A expressão gênica de SREBP-2 também diminuiu na presença de hidrolisado proteico, e por consequência, a expressão de HMGR também foi reduzida. Em todas as comparações, a concentração mais elevada e o tempo de exposição contribuíram para o efeito redutor.

O isolado proteico de amaranto foi capaz de reduzir a expressão gênica do transportador ABCG8 em hamsters hipercolesterolemizados, porém sem alteração de outros genes. Contudo, houve redução de colesterol plasmático evidenciado em pesquisa anterior.

Nosso grupo de pesquisa do laboratório de propriedades funcionais dos alimentos vem demonstrando uma ação positiva do efeito dos peptídeos de amaranto

sobre a colesterolemia. Entretanto, são necessários estudos complementares para elucidar os mecanismos celulares envolvidos nas diversas vias metabólicas.

8. REFERÊNCIAS

ABIA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. **Compêndio da legislação de alimentos**. São Paulo. 1991. v. 2/A, p. 7-33.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association Chemistry**. 18. Gaithersburg: 2010.

ARTURSSON, P.e BORCHARDT, R. T. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond.**Pharmaceutical research**, v. 14, p. 1655-1658, 1997

ASSIS-VAZ, L. C. M. A. **Efeito da ingestão de proteína de amaranto no metabolismo do colesterol em ratos**. São Paulo, 2010. Dissertação (Mestrado em Nutrição em Saúde Pública). Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo, São Paulo.

BALIMANE, P. V. e CHONG, S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique.**Drug discovery today**, v. 10, p. 335-343, 2005.

BETTERS, J. L. e YU, L. NPC1L1 and Cholesterol Transport. **FEBS Letters**, v.584, p. 2740-2747, 2010.

BOACHIE, R.; YAO, S.; UDENIGWE, C. C. Molecular mechanisms of cholesterol-lowering peptides derived from food proteins.**Current opinion in Food Safety**, v. 20, p. 58-63, 2018.

BOER, J. F., KUIPERS, F. e GROEN, A. K. Cholesterol Transported Revisited: A New Turbo Mechanism to Drive Cholesterol Excretion.**Cell Press Reviwes: Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 29, p. 123-133, 2018.

BROWN, M. S. e GOLDSTEIN, J. L. The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor.**Cell**, v. 89, p. 331-340, 1997.

CARLOS-MENEZES, A. C. C. C. **Efeito do hidrolisado proteico do grão de amaranto *(Amaranthus cruentus L.* BRS Alegria*)* processado na solubilização**

micelar do colesterol e inibição da HMGR. São Paulo, 2013.Dissertação (Mestrado em Nutrição em Saúde Pública). Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

CARROLL, K. K. e KUROWSKA. Soy Consumption and Cholesterol Reduction: Review of Animal Studies.**The Journal of Nutrition**, v.125, p.594S-597S, 1995.

CHOMCZYNSKI, P.e SACCHI,N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analitical Biochemistry**, v. 162, p. 156-159, 1987.

COHEN, L. H.; GRIFFIOEN, M.; HAVEKES, L.; SCHOUTEN, D.;VAN HINSBERGH, V. e KEMPEN, H. J. Effects of compactin, mevalonate and low-density lipoprotein on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity and low-density-lipoprotein-receptor activity in the human hepatoma cell line Hep G2.**Biochemistry Journal**, v. 222, p. 35-39, 1984.

COHN, J. S.;KAMILI, A.; WAT, E.; CHUNG, R. W. S. e TANDY, S. Reduction in intestinal cholesterol absorption by various food components: Mechanisms and implications.**Atherosclerosis Supplements**, v. 11, p. 45-48, 2010.

CONSONNI, A.; LOVATI,M. R. ;MANZONI, C.; PIZZAGALLI, A.; MORAZZONI, P.e DURANTI, M. Cloning, yeast expression, purification and biological activity of a truncated form of the soybean 7S globulin α′ subunit involved in Hep G2 cell cholesterol homeostasis.**The Journal of nutritional biochemistry**, v. 21, p. 887-891, 2010.

COSKUN, A.; SERTESER, M.e UNSAL, I. Inhibition of cholesterol biosynthesis in hypercholesterolemia - is it the right choice?.**Journal of Medical Biochemistry**, v. 32, p. 16-19, 2013.

DANIELS, T. F; KILLINGER, K. M.; MICHAL, J. J.; WRIGHT, R. W. JR.; JIANG, Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis, and cardiac health.**Int. J Biol Sci**., v. 5, p. 474-88, 2009.

DEMINA, E. P.; MIROSHNIKOVA, V. V.; SCHWARZMAN, A. L. Role of the ABC transporters A1 and G1, key reverse transport proteins, in atherosclerosis.**Molecular Biology**, v. 50, n.2, p.223-230, 2016.

DING, L.; WANG, L.; ZHANG, Y.; LIU, J. Transport of antihypertensive peptide RVPSL, ovotransferrin 328-332, in human intestinal caco-2 cell monolayers.**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 37, p. 8143-8150, 2015.

DZIUBA, J.; IWANIAK, A.e MINKIEWICZ, P. Computer-aided characteristics of proteins as potential precursors of bioactive peptides.**Polimery**, v. 48, p. 50-53, 2003.

ERDMANN, K.; CHEUNG,B. W. Y.e SCHRODER, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease.**Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, p. 643-654, 2008.

ERICKSON, S. K., e. FIELDING, P. E. 1986, Parameters of cholesterol metabolism in the human hepatoma cell line, Hep-G2.**Journal of Lipid Research**, v. 27, p. 875-883, 1986.

FALUDI, A. A.; IZAR, M.C.O.; SARAIVA, J.F.K.; CHACRA, A.P.M.; BIANCO, H.T.;AFIUNE NETO A.*et al*. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017.**Arq Bras Cardiol**, v. 109, n. 2/1, p.1-76, 2017.

FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. **Introduction to lipids and lipoproteins**. 2015. Disponível em:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/

FERREIRA, T. A. P. D. C. e ARÊAS, J. A. G. Protein biological value of extruded, raw and toasted amaranth grain.**Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 34, p. 53-59, 2004.

FERREIRA, T. A. P. D. C.; MATIAS, A. C. G e ARÊAS, J. A. G. Características funcionais e nutricionais do amaranto (*Amaranthus spp*.).**Nutrire**, v. 32, p. 91-116, 2007.

FILLERÍA, S. F. G.; TIRONI, V. A. Prevention of in vitro oxidation of low density lipoproteins (LDL) by amaranth peptides released by gastrointestinal digestion.**Journal of Functional Foods**, v. 34, p. 197–206, 2017.

FREITAS, R. A. M. S.**Avaliação da biodisponibilidade e mecanismos de ação hipocolesterolemizante de peptídeos de amaranto (Amaranthus cruentus L. BRS-Alegria)**. São Paulo. 2017. Tese (Doutorado em Nutrição em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

FURLLERTON, M. D., FORD, R. J., MCGREGOR, C. P., LEBLOND, N. D., SNIDER, S.A., STYPA, S.A., DAY, E.A., LHOTAK, S., SCHERTZER, J. D., AUSTIN, R. C., KEMP, B. E. e STEINBERG, G. R. Salicylate improves macrophage cholesterol homeostasis via activation of Ampk.**Journal of Lipids Research**, v. 56, p. 1025-1033, 2015.

GENVIGIR, F. D.,. RODRIGUES, A. C. CERDA, A., HIRATA, M. H. CURI, R. e HIRATA, R. D. ABCA1 and ABCG1 expressions are regulated by statins and ezetimibe in Caco-2 cells.**Drug Metabol Drug Interact**, v. 26, p. 33-36, 2011.

GENVIGIR, F. D. V., RODRIGUES, A. C., CERDA, A., ARAZI, S. S., VIEIRA WILLRICH, M. A., OLIVEIRA, R., HIRATA, M. H., DOREA, E. L., BERNIK, M. M., CURI, R.e HIRATA, R. D. C. Effects of lipid-lowering drugs on reverse cholesterol transport gene expressions in peripheral blood mononuclear and HepG2 cells.**Pharmacogenomics**, v. 11, p. 1235-1246, 2010.

GOLDSTEIN, J. L. e. BROWN, M. S. Regulation of the mevalonate pathway.**Nature**, v. 343, p. 425, 1990.

GOODMAN, B. E. Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans.**Advances in Physiology Education**, v. 34, p. 44-53, 2010.

GULLÓN, B.; GULLÓN, P.; TAVARIA, F.K..; YÁÑEZ, R. Assessment of the prebiotic effect of quinoa and amaranth in the human intestinal ecosystem. **Food & Function,** v.7, n.9, p. 3782–3788, 2016.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications.**Current Opinion in Biotechnology,** v. 18, n. 2, p. 163-169, 2007.

HERNANDEZ-LEDESMA, B.; RECIO,I.; AMIGO, L. 2008, beta-Lactoglobulin as source of bioactive peptides.**Amino Acids**, v. 35, p. 257-265, 2008.

HOWARD, A. e UDENIGWE, C. C. Mechanisms and prospects of food protein hydrolysates and peptide-induced hypolipidaemia.**Food & function**, v. 4, p. 40-51, 2013.

HOYLE, N.T.; J.H. MERRIT. Quality of fish protein hydrolysate from Herring (Clupea harengus).**Journal of Food Science**, 59: 76-79, 1994.

IQBAL, J. e HUSSAIN, M. M. Intestinal lipid absorption.**American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 296, p. E1183-E1194, 2009.

JENKINS, D. J., KENDALL, C. W., MARCHIE, A. FAULKNER, D. A., WONG, J. M., DE SOUZA, R., EMAM, A., PARKER, T. L., VIDGEN, E., LAPSLEY, K. G., TRAUTWEIN, A., JOSSE, R. G., LEITER, P. W. C. Effects of a dietary portfolio of cholesterol-lowering foods vs lovastatin on serum lipids and C-reactive protein.**Jama**, v. 290, n. 4, p.502-510, 2003.

JO, Y. e DEBOSE-BOYD, R. A.Control of cholesterol synthesis through regulated ER-associated degradation of HMG CoA reductase.**Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 45, p. 185-198, 2010.

KE, R., QICAO, X., LI, C., LUO, L. e HUANG, D. Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism.**Cell Biology International**, v. 42, n. 4, p. 384-392, 2018.

KERSTEN, S., DESVERGNE, B. e. WAHLI, W. Roles of PPARs in health and disease.**Nature**, v. 405, p. 421-424, 2000.

KEUNEN, K.; van ELBURG, R. M.; van BEL, F.; BENDERS, M.. Impact of nutrition on brain development and its neuroprotective implications following preterm birth.**Pediatric Research**, v. 77, n. 1, p. 148-155, 2015.

KIM J. et al. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities.**Exp Mol Med**., v. 1, n. 48, p. 224, 2016.

KOLDAMOVA, R., FITZ, N. F.e. LEFTEROV, I. ATP-binding cassette transporter A1: From metabolism to neurodegeneration.**Neurobiology of Disease**, v. 72, p. 13-21, 2014.

KUMAR, A. B., LAKSHMAN, K., JAYAVEERA, K., NANDEESH, R., MANOJ, B. e RANGANAYAKULU, D. Comparative in vitro anthelmintic activity of three plants from the Amaranthaceae family.**Archives of Biological Sciences**, v. 62, p. 185-189, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.**Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMMI, C., C. ZANONI, G. M. SCIGLIUOLO, A. D'AMATO e ARNOLDI, A. Lupin Peptides Lower Low-Density Lipoprotein (LDL) Cholesterol through an Up-regulation of the LDL Receptor/Sterol Regulatory Element Binding Protein 2 (SREBP2) Pathway at HepG2 Cell Line.**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 7151-7159, 2014.

LERNER, A.; MATTHIAS, T. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune desease. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 6, p. 479-489, 2015.

LIMPEANCHOB, N., TRISAT, K., DUANGJAI, A., TIYABOONCHAI, W., PONGCHAROEN, S., SUTHEERAWATTANANONDA, M. Sericin reduces serum cholesterol in rats and cholesterol uptake into caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p.12519-12522, 2010.

LIPKIN, A., ANISIMOVA, V., NIKONOROVA, A, BABAKOV, A., KRAUSE, E., BIENERT, M., GRISHIN, E. e EGOROV, T. An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds.**Phytochemistry**, v. 66, p. 2426-2431, 2005.

LIU, X., HAO, J.-J., ZHANG, L.-J., ZHAO, X., HE, X.-X., LI, M.-M., ZHAO, X.-L., WU, J.-D., QIU, P.-J. e YU, G.-L. Activated AMPK explains hypolipidemic effects of sulfated low molecular weight guluronate on HepG2 cells.**European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 304-310, 2014.

LIVAK, K. J.e SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.**Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

MA, K., MALHOTRA, P., SONI, V., HEDROUG, O., ANNABA, F., DUDEJA, A., SHEN, L., TURNER, J. R., KHRAMTSOVA, E. A.e SAKSENA, S. Overactivation of Intestinal SREBP2 in Mice Increases Serum Cholesterol.**PloS one**, v. 9, p. e84221, 2014.

MARQUES, M. R.; FONTANARI, G. G.; PIMENTA, D. C.; SOARES-FREITAS, R. M.; ARÊAS, J. A. G. Proteolytic hydrolysis of cowpea proteins is able to release peptideswith hypocholesterolemic activity.**Food Research Internationa**l , v. 77, p. 43-8, 2015.

MARQUES, M. R.; CERDA, A.; FONTANARI, G. G.; PIMENTA, D. C.; SOARES-FREITAS, R. M.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. e ARÊAS, J. A. G. Transport of cowpea bean derived peptides and their modulator effects on mRNA expression of cholesterol-related genes in Caco-2 and HepG2 cells. **Food Research International**, v. 107, p.165-171, 2018.

MARTÍNEZ, E. N. e AÑÓN, M. C. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study.**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2523-2530, 1996.

MATSUOKA, R.; KIMURA, M.; MUTO, A.; MASUDA, Y.; SATO, M.; IMAIZUMI K. Mechanism for the cholesterol-lowering action of egg white protein in rats. **Biosci Biotechnol Biochem**., v. 72, p. 506-1512, 2008.

MEGÍAS, C.; PEDROCHE, J.; DEL MAR YUST, M;, ALAIZ, M.; GIRÓN-CALLE, J.; MILLÁN, F.e VIOQUE, J. Stability of sunflower protein hydrolysates in simulated gastric and intestinal fluids and Caco-2 cell extracts.**LWT-Food Science and Technology**, v. 42, p. 1496-1500, 2009.

MENDONÇA, S. et al. Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect.**Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 738-742, 2009.

MEHTIEV, A. R.; FEDCHENKO, V. I.; TKACHEV, Y. V.; TIMOFEEV, V. P. e MISHARIN, A. Y. Regulation of cholesterol biosynthesis and metabolism in Hep G2 cells by Δ8(14)-15-ketoergostane derivatives.**Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry**, v. 4, p. 251-257, 2010.

MÖLLER, N. P. et al. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects.**European Journal of Nutrition,** v. 47, n. 4, p. 171-182, 2008.

MONTOYA-RODRÍGUEZ, A.; GÓMEZ-FAVELA, M. A.; REYES-MORENO, C.; MILÁN-CARRILLO, J.; de MEJÍA, E. G. Identification of bioactives peptides sequences from amaranth (Amaranthus hypochondriacus) seed proteins and their potential role in the prevention of chronic diseases.**Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, p. 139-158, 2015.

MORAZZONI, P.; RIVA, A.; PONZONE, C.; BERLANDA, D.; DURANTI, M. e. CONSONNI, A.**Cloning, yeast expression, purification and biological activity of the extension region of the soybean 7S globulin alfa'subunit involved in HEP G2 cell cholesterol homeostasis:**Google Patents, 2013.

MUKHERJIE, S.; ZHA, X.; TABAS, I. e MAXFIELD, F. R. Cholesterol distribuition in living cells: fluorescence imaging using dehydroergosterol as fluorescent cholesterol analog.**Biophys Journa**l, v. 75, p. 1915-1925, 1998.

NAGAOKA, S.; FUTAMURA, Y.; MIWA, K.; AWANO, T.; YAMAUCHI, K.; KANAMARU, Y.; TADASHI, K. e KUWATA, T. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-lactoglobulin.**Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 281, p. 11-17, 2001.

NAGAOKA, S.; NAKAMURA, A.; SHIBATA, H.; KANAMARU, Y. Soystatin (VAWWMY), a novel bile acid-binding peptide, decreased micellar solubility and inhibited cholesterol absorption in rats.**Biosci Biotechnol Biochem**, v. 74, p. 1738-1741, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL.**Lost crops of the Incas:Little-known plants of the Andes with promise for the worldwide cultivation**: Washington, National Academy Press, 1989.

OLFERT, E.; CROSS, B.M.; MCWILLIAN, A.A. **Guide to care and use for experimental animal**. 2 ed., v.1, Canadian Council, 1993.

ORAM, J. F.; LAWN, R. M. ABCA1: the gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol.**Journal of Lipid Research,** v. 42, p. 1173-1179, 2011.

PAK, V. V.; KOO, M.; LEE, N.; KIM, M. S. e KWON, D.Y. Structure-activity relationships of the peptide Ile-Ala-Val-Pro and its derivatives revealed using the semi-empirical AM1 method. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, p. 454-460, 2005b.

PAK, V. V.; KOO, M.; LEE, N.; OH, S. K.; KIM, M. S.; LEE, J. S.eKWON,D. Y. Hypocholesterolemic soybean peptide (IAVP) inhibits HMG-CoA reductase in a competitive manner.**Food Science and Biotechnology**, v. 14, p. 727-731, 2005a.

PAL, M. e KHOSHOO, T. N.**Grain amaranths studies in world crops.**J. HutchinsonEvolutionary: Cambridge, England, Cambridge University Press, p. 175, 1974.

PENG, C.-H.; CHANG, H.-C.; YANG, M.-Y.; HUANG, C.-N.; WANG, S.-J. e WANG, C.-J. Oat attenuate non-alcoholic fatty liver and obesity via inhibiting lipogenesis in high fat-fed rat.**Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 53-61, 2012.

PFEUFFER, M. Differences in the underlying mechanisms of cholesterol and casein induced hypercholesterolemia in rabbit and rat.**Artherosclerosis**, v. 76, p. 89-91, 1989.

PICARIELLO, G.; IACOMINO, G.; MAMONE, G.; FERRANTI, P.; FIERRO, O.; GIANFRANI, C.; DI LUCCIA, A.; ADDEO, F. Transport across Caco-2 monolayers of peptides arising from *in vitro* digestion of bovine milk proteins.**Food Chemistry**, v.139, n.1-4, p. 203-212, 2013.

QIN, J.; HERRING, C. J. e ZHANG, X. L. De novo peptide sequencing in an ion trap mass spectrometer with O-18 labeling.**Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 12, p. 209-216, 1998.

QUINTÃO, E. C. R.;NAKANDAKARE, E. R.; PASSARELLI, M. **Lípides: do metabolismo à aterosclerose.**São Paulo: Ed. Savier, 2011, p. 1-85.

RADTKE, J.; GEISSLER, S.; SCHUTKOWSKI, A.; BRANDSCH, C.; KLUGE, H., DURANTI, M. M.; KELLER, S.; JAHREIS, G.; HIRCHE, F., e STANGL, G. I. Lupin protein isolate versus casein modifies cholesterol excretion and mRNA expression of intestinal sterol transporters in a pig model. **Nutrition & metabolism**, v. 11, p. 1-9, 2014.

RAHMAN, F.; AFROZ, S.; JAHAN, S.; HOSAIN, M.; KHONDOKER, D. F.; RAHMAN, S. M.;BANIK, J.; AHMAD, I. e RAHMATULLAH, M. Antihyperglycemic and antinociceptive properties of methanolic extract of whole plants of Amaranthus viridis L.(Amaranthaceae).**Advances in Natural & Applied Sciences**, v..6, p. 13-30, 2012.

RASTOGI, A. e SHUKLA, S. Amaranth: A New Millennium Crop of Nutraceutical Values.**Critical reviews in food science and nutrition**, v. 53, p. 109-125, 2013.

ROMERO-ZEPEDA, H.; PAREDES-LOPEZ, O. Isolation and characterization of amarantin, the 11S amaranth seed globulin.**Journal of food biochemistry,** v. 19, n. 5, p. 329-339, 1995.

ROBERTSON, K. R. The General of Amarantaceae in the south eastern United States.**Journal of The Arnold Arboretum**, v. 62, p. 47, 1981.

SABEVA, N. S.; LIU, J.; GRAF, G. A. The ABCG5/ABCG8 sterol transporter and phytosterols: implications for cardiometabolic disease.**Current opinion in endocrinology, diabetes and obesity**, v. 16, p. 172-177, 2009.

SALCEDO-CHAVEZ, B.; OSUNA-CASTRO, J. A.; GUEVARA-LARA, F.; DOMIANGUEZ-DOMIANGUEZ, J.; PAREDES-LOPEZ, O. Optimization of the Isoelectric Precipitation Method To Obtain Protein Isolates from Amaranth (Amaranthus cruentus) Seeds.**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6515-20, 2002.

SALVIA-TRUJILLO, L.; VERKEMPINCK, S. H. E.; VAN LOEY, A. M.; GRAUWET, T.; HENDRICKX, M. E. Lipid digestion, micelle formation and carotenoid bioaccessibility kinetics: influence of emulsion droplet size.**Food Chemistry,** v. 229, p. 653-662, 2017.

SANZ-BUENHOMBRE, M.; VILLANUEVA, S.; MORO, C.; TOMÁS-COBOS, L.; VIADEL, B. e GUADARRAMA, A. Bioavailability and the mechanism of action of a grape extract rich in polyphenols in cholesterol homeostasis.**Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 178-185, 2016.

SCILINGO, A. A.; ORTIZ, S. E. M.; MARTÍNEZ, E. N.; AÑÓN, M. C. Amaranth protein isolates modified by hydrolytic and thermal treatments. Relationship between structure and solubility.**Food Research International**, v. 35, p. 855–62, 2002.

SCURIATTI, M.; TOMÁZ, M.; WAGNER, J. Influence of soybean protein isolates phosphatidylcholine interaction on the stability on oil-in-water emulsions.**Journal of the America Oil Chemists Society**, v. 80, n. 11, p. 1093-1100, 2003.

SINGH, V.; JAIN, M.; MISRA, A.; KHANNA, V.; RANA, M.; PRAKASH, P.; MALASONI, R.; DWIVEDI, A. K.; DIKSHIT, M.; BARTHWAL, M. K. Curcuma oil ameliorates hyperlipidaemia and associated deleterious effects in golden Syrian hamsters.**British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 3, p. 437-46, 2013.

SIRTORI, C. R.; LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; CASTIGLIONI, S.; DURANTI, M.; MAGNI, C.; MORANDI, S.; D'AGOSTINA, A. e ARNOLDI, A. Proteins of white lupin seed, a naturally isoflavone-poor legume, reduce cholesterolemia in rats and increase LDL receptor activity in HepG2 cells.**The Journal of nutrition**, v. 134, p. 18-23, 2004.

SOARES, R. A. M.; MENDONÇA, S.; de CASTRO, L. I. A.; MENEZES, A. C. C. C. C.; ARÊAS, J. A. G. Major peptides from amaranth (*Amaranthus cruentus*) protein inhibit HMG-CoA reductase activity.**International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 2, p. 4150-4160, 2015.

SOSULSKI, F. W.; IMAFIDON, G. I. Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods.**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 1351-6, 1990.

TAKENAKA, Y., NAKAMURA, F., YAMAMOTO, T. e YOSHIKAWA, M. Enterostatin (VPDPR) and its peptide fragment DPR reduce serum cholesterol levels

after oral administration in mice.**Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, p. 1620-1622, 2003.

TEUTÔNICO, R. A.; KNORR, D. Amaranth: composition, properties and applications of a rediscovered food crop.**Food Technology**, v. 39, p. 49-60, 1985.

TIENGO, A., MOTTA, E. M. P. e NETTO, F. M. Chemical Composition and Bile Acid Binding Activity of Products Obtained from Amaranth (*Amaranthus cruentus*) Seeds. **Plant foods for human nutrition**, v. 66, p. 370-375, 2011.

TOVAR-PÉREZ, E. et al. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain.**Food Chemistry,** v. 116, n. 2, p. 437-444, 2009.

TRANSUE, D.; FAIRBANKS, D.; ROBISON, L. eANDERSEN, W. Species identification by rapd analysis of grain amaranth genetic-resources.**Crop Science**, v. 34, p. 1385-1389, 1994.

TRISAT, K.; WONG-ON, M.; LAPPHANICHAYAKOOL, P.; TIYABOONCHAI, W.; LIMPEANCHOB, N. Vegetable juices and fibers reduce lipid digestion or absorption by inhibiting pancreatic lipase, cholesterol solubility and bile acid binding.**International Journal of Vegetable Science**, v. 23, n.3, p. 260-269, 2017.

VAN DER WULP, M. Y.; VERKADE, H. J. e GROEN, A. K. Regulation of cholesterol homeostasis.**Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 368, p. 1-16, 2013.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N., DE PAEPE, A. e SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.**Genome Biology**, v. 3,Vp. 1-12, 2002.

YI-SHEN, Z.; SHUAI, S.; FITZGERALD, R. Mung bean proteins and peptides: nutritional, functional and bioactives properties. **Food & Nutrition Research**, v. 60, p. 1-11, 2018.

YU, L. *et al*. Cholesterol - regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilities free cholesterol uptake. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, p. 6616-6624, 2006.

YUN, S. M.; HABICHT, J. P.; MILLER, D. D. e GLAHN, R. P. An in vitro digestion/Caco-2 cell culture system accurately predicts the effects of ascorbic acid and polyphenolic compounds on iron bioavailability in humans.**Journal of Nutrition**, v. 134, p. 2717-2721, 2004.

ZHANG, H.; YOKOYAMA, W. H.e ZHANG, H. Concentration-dependent displacement of cholesterol in micelles by hydrophobic rice bran protein hydrolysates.**Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 1395-1401, 2012.