

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA**

**Efeito da ingestão de suco de uva sobre a expressão
de microRNA no plasma e em células
mononucleares em mulheres com sobrepeso**

Bruna Jardim Quintanilha

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Nutrição em Saúde Pública para
defesa de Doutorado.

Área de concentração: Nutrição em Saúde
Pública

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo
Rogerio

São Paulo
2022

Efeito da ingestão de suco de uva sobre a expressão de microRNA no plasma e em células mononucleares em mulheres com sobrepeso

Bruna Jardim Quintanilha

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Nutrição em Saúde Pública para defesa de Doutorado.

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero

São Paulo
2022

Agradecimentos

Minha gratidão aos meus pais e irmão os quais sempre me deram amor e força para vencer os obstáculos da vida.

Agradeço ao meu orientador por acreditar em mim e pela amizade durante todos estes anos.

Agradeço ao meu namorado, Marcelo Ueno, pelo apoio e carinho durante esta jornada.

Agradeço...

Ao meu colega, Vinícius Cooper, pela parceria e cafés.

À Geni Sampaio, pela amizade e suporte.

Às voluntárias, por possibilitar este trabalho.

Aos colegas do GENUIN, pela companhia.

Ao FORC (Food Research Center)/FAPESP,

Ao Centro de Saúde Escola Geraldo de Paula e Souza

E a todos os colaboradores deste estudo.

QUINTANILHA, B. J. **Efeito da ingestão de suco de uva sobre a expressão de microRNA no plasma e em células mononucleares em mulheres com sobrepeso.** 2021. Tese – Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, 2021.

Resumo

Introdução: O padrão da dieta ocidental, caracterizado pela ingestão elevada de açúcares e lipídios, está relacionado à gênese da inflamação metabólica, a qual é caracterizada por um quadro de inflamação crônica, sistêmica e de baixa intensidade. A inflamação metabólica contribui para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), as quais representam a principal causa de morte no mundo. Por outro lado, a ingestão de uma dieta saudável, rica em frutas e hortaliças, é relevante para a redução do risco das DCNT. Nesse contexto, destaca-se o suco de uva, bebida rica em compostos bioativos, que possui potencial efeito anti-inflamatório. Estudos recentes sugerem que nutrientes e compostos bioativos dos alimentos possam atenuar a inflamação por meio da modulação da expressão de microRNA, os quais representam novos biomarcadores inflamatórios, contribuindo para a identificação do risco de desenvolvimento de doenças cardiometabólicas. **Objetivo:** Investigar o efeito da ingestão de suco de uva integral sobre a expressão de microRNA no plasma e em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e sua relação com a resposta inflamatória. **Métodos:** Estudo intervencional, no qual, durante quatro semanas, as voluntárias ingeriram 500 mL diários de suco de uva integral, com coletas de sangue no momento basal, 2 e 4 semanas após o início da ingestão da bebida. A população do estudo foi composta por mulheres saudáveis (n = 20), com idade entre 18 e 40 anos e índice de massa corpórea classificado como sobrepeso (25,0 - 29,9 kg/m²). Foram avaliados o perfil lipídico, o hemograma e as concentrações plasmáticas de glicose, insulina, leptina, adiponectina, lipopolissacarídeos e seus ligantes plasmáticos LBP e sCD14 e biomarcadores inflamatórios (IL-10, IL-6, TNF- α , proteína C reativa, MCP-1, VCAM-1 e ICAM-1), bem como a concentração dos principais compostos bioativos presentes no suco de uva. Dois painéis de microRNA, sendo um plasmático e outro de PBMC, de 8 indivíduos foram avaliados, em todos os tempos, pelo ensaio de PCR em tempo real. Posteriormente, foram selecionados os microRNA relacionados à resposta inflamatória e à endotoxemia metabólica, os quais foram avaliados no restante das voluntárias. As proteínas-alvo dos microRNA em

PBMC foram analisadas por *Western Blotting*. O consumo alimentar foi avaliado pela análise de três recordatórios de 24 horas coletados em todos os tempos experimentais. **Resultados:** A ingestão de suco de uva, após 4 semanas de intervenção, em PBMC, promoveu redução da expressão gênica do TNF- α , IL-6 e das subunidades p50 e p65, as quais compõem o fator de transcrição NF-kB. Em relação ao conteúdo de proteínas nestas células, houve apenas diminuição da fosforilação da TAK-1 em relação ao seu conteúdo total. Dentre os miRNA analisados, o miR-144-5p e o miR-144-3p tiveram a sua expressão aumentada no plasma e em PBMC, respectivamente. A concentração plasmática de sICAM-1 reduziu significativamente na semana 4 em relação a semana 2, enquanto, a concentração plasmática de gama glutamil transferase aumentou significativamente na última semana. As voluntárias apresentaram menor pressão arterial diastólica no final do estudo em relação ao momento basal. **Conclusão:** A ingestão do suco de uva, após 4 semanas de intervenção, influenciou a concentração de biomarcadores relacionados ao processo inflamatório mediado pela via do fator de transcrição NF-kB em mulheres com sobrepeso.

Palavras-chave: inflamação, microRNA, suco de uva, compostos bioativos, endotoxemia.

QUINTANILHA, B. J. [Effect of grape juice ingestion on microRNA expression in plasma and mononuclear cells in overweight women]. 2021. Tese – Faculdade de Saúde Pública da USP, Sao Paulo, 2021. Portuguese.

Abstract

Introduction: The Western diet pattern, characterized by excessive ingestion of sugars and lipids, is related to the genesis of metabolic inflammation, which is characterized by a condition of a chronic, systemic, and low-grade inflammation. Metabolic inflammation contributes to the development of chronic non-communicable diseases (NCDs), the leading cause of death in the world. On the other hand, the adoption of a healthy diet rich in fruits and vegetables is relevant to reduce the risk of NCDs. Grape juice is a beverage rich in bioactive compounds which have a potential anti-inflammatory effect. Recent studies suggest that nutrients can modulate inflammation through microRNAs action, which have been highlighted because they are new inflammatory biomarkers, contributing to the identification of the risk of cardiometabolic diseases. **Objective:** Investigate the effect of the grape juice ingestion on microRNA expression in plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and its relationship with the development of the inflammatory process. **Methods:** Interventional study, in which, for four weeks, the volunteers ingested 500 mL of whole grape juice daily, with blood drawn at baseline, 2 and 4 weeks after the intake. The study population consisted of healthy women (n = 20), aged between 18 and 40 years and body mass index classified as overweight (25.0 - 29.9 kg/m²). The lipid profile, blood count and plasma concentrations of glucose, insulin, leptin, adiponectin, lipopolysaccharides, and their plasma ligands LBP and sCD14 and inflammatory biomarkers (IL-10, IL-6, TNF- α , C-reactive protein, MCP-1, VCAM-1 and ICAM-1) were evaluated, as well as the concentration of the main bioactive compounds present in grape juice. Two microRNA panels, one plasma and the other PBMC, from 8 individuals were evaluated, at all times, by real-time PCR. Subsequently, microRNAs related to the inflammatory response and metabolic endotoxemia were selected, which were evaluated in the rest of the volunteers. MicroRNA target proteins in PBMC were analyzed by Western Blotting. Food consumption was assessed by analyzing three 24-hour recalls collected at all experimental times. **Results:** The intake of grape juice, after 4 weeks of intervention, in PBMC, promoted a reduction in gene expression of

TNF- α , IL-6 and p50 and p65 subunits, which composes the NF-kB transcription factor. Regarding the protein content in these cells, there was only a decrease in TAK-1 phosphorylation in relation to its total content. Among the analyzed miRNAs, miR-144-5p and miR-144-3p had their expression increased in plasma and in PBMC, respectively. The plasma concentration of sICAM-1 significantly reduced in week 4 compared to week 2, while the plasma concentration of gamma glutamyl transferase increased significantly in the last week. The volunteers had lower diastolic blood pressure at the end of the study compared to baseline. **Conclusion:** The intake of grape juice after 4 weeks of intervention influenced the concentration of biomarkers related to the inflammatory process mediated by the transcription factor NF-kB pathway in overweight women.

Keywords: inflammation, microRNA, grape juice, bioactive compounds, endotoxemia.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 JUSTIFICATIVA	16
3 HIPÓTESE	17
4 OBJETIVO	18
5 MÉTODOS	19
5.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO	19
5.1.1 Caracterização das participantes	20
5.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO	21
5.3 SUCO DE UVA INTEGRAL	22
5.3.1 Caracterização do suco de uva integral.....	23
5.4 COLETA DE SANGUE E SEPARAÇÃO CELULAR	27
5.4.1 Separação das Células Mononucleares.....	27
5.4.2 Análises bioquímicas	28
5.4.6 Análise da Expressão de mRNA em PBMC por RT-qPCR.....	30
5.4.8 Análise da expressão de miRNA no plasma e em PBMC.....	31
5.4.7 Análise de Proteínas por <i>Western Blotting</i>	34
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
6 RESULTADOS	36
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	36
6.2 ANÁLISE DO CONSUMO ALIMENTAR (RECORDATÓRIO DE 24 HORAS)	37
6.3 ANÁLISE DO PERFIL ANTROPOMÉTRICO E BIOQUÍMICO NOS TRÊS TEMPOS DE INTERVENÇÃO.....	38
6.4 ANÁLISE DOS BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS NOS TRÊS TEMPOS DA INTERVENÇÃO	40
6.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE mRNA EM PBMC NOS TRÊS TEMPOS DA INTERVENÇÃO..	42
6.6 ANÁLISE DO CONTEÚDO PROTEICO TOTAL E FOSFORILADO EM PBMC NOS TRÊS TEMPO DE INTERVENÇÃO	44
6.7 ANÁLISE DOS microRNA NO PLASMA E EM PBMC NOS TRÊS TEMPOS DA INTERVENÇÃO	47
6.7.1 Plasma	47
6.7.1 PBMC.....	49
7 DISCUSSÃO	51
8 CONCLUSÃO	56
9 REFERÊNCIAS	57

LISTA DE ABREVIÇÕES

DCNT - doenças crônicas não transmissíveis

IMC - índice de massa corporal

MCP-1 - proteína quimioatrativa para monócitos-1

VCAM-1 - molécula de adesão celular vascular-1

ICAM-1 - molécula de adesão intercelular-1

TNF-alfa - fatores de necrose tumoral-alfa

IL-1 beta - interleucina-1 beta

IL-6 - interleucina-6

IL-10 - interleucina-10

TNFR1 - receptor do fator de necrose tumoral 1

ERK - quinase regulada por sinais extracelulares

JNK - c-Jun N-amino-terminal

AP-1 - proteína ativadora-1

SAA - proteína sérica amiloide A

PCR - proteína C reativa

TLR4 - receptor do tipo Toll 4

IRS-1 - receptor de insulina-1

AGNE - ácidos graxos não esterificados

LPL - lipase de lipoproteína

LDL - lipoproteínas de baixa densidade

VLDL - lipoproteínas de muito baixa densidade

NF-kB - fator nuclear kappa B

TAK-1 - quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador β

IKK – quinase do I kappa B

IkB – inibidor do kappa B

LPS - lipopolissacarídeo

LBP - proteína ligadora de LPS

CD14 - diferenciação de cluster 14

MiRNA - microRNA

AGO - proteína Argonauta

RISC - complexo-RNA de indução de silenciamento

LncRNA - RNA longos não-codificantes

pRNA - RNA promotores não-codificantes

ORP-8 - proteína de ligação ao oxisterol

TRAF6 - receptor de TNF associado ao fator 6

IRAK1 - receptor de interleucina 1 associado à quinase 1

QFA - questionário de frequência alimentar

1 INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, câncer, entre outras, representam a principal causa de morte no mundo, correspondendo a cerca de 71% das mortes (OMS, 2021). No Brasil, este quadro não é diferente, 54,7% dos brasileiros morrem devido às DCNT, em destaque, por doenças cardiovasculares (126 óbitos por 100 mil habitantes) e neoplasias (109 óbitos por 100 mil habitantes). As DCNT são responsáveis por um gasto público com internações de, aproximadamente, 8,8 bilhões de reais por ano (BRASIL, 2021).

O crescente estudo sobre os mecanismos fisiopatológicos e fatores de risco das DCNT mostra que a composição corporal do indivíduo pode estar relacionada ao processo de desenvolvimento destas comorbidades (SAFAEI et al., 2021). Neste contexto, dados epidemiológicos apontam tendência ao crescimento do número de indivíduos com excesso de peso, sendo que, em 2025, a previsão é que este quadro acometa 3 bilhões de indivíduos no mundo, o que refletirá na prevalência das DCNT (OMS, 2013). No Brasil, hoje, estima-se que mais de 60,3% dos adultos tenham excesso de peso (IBGE, 2019).

Como ferramenta para classificar a população mediante este aspecto, a OMS (1995) utiliza o índice de massa corporal (IMC), calculado pela razão entre o peso (kg) e estatura (m) ao quadrado, por se tratar de uma medida de fácil acesso e baixo custo. Segundo o IMC, os indivíduos que apresentam o resultado inferior a 18,5 kg/m² são considerados com baixo peso; entre 18,5 e 24,9 kg/m², eutróficos; entre 25,0 e 29,9 kg/m², com sobrepeso; e acima de 30,0 kg/m², obesos. O termo “excesso de peso” engloba tanto indivíduos com sobrepeso quanto obesos (OMS, 1995).

Além disso, pesquisadores observaram que a diferença anatômica de deposição de gordura no corpo humano teria divergência na resposta fisiológica e, desse modo, a medida da circunferência da cintura foi incorporada como um novo parâmetro para complementar o IMC, uma vez que avalia a presença de gordura na região abdominal, característica do acúmulo do tecido adiposo visceral, o qual está associado ao aumento da predisposição às DCNT (DE OBESIDADE, 2016, UNAMUNO et al., 2018).

O acúmulo excessivo de gordura corporal acarreta em um quadro de inflamação crônica, sistêmica e de baixa intensidade, o qual difere daquele verificado em situações que apresentam agentes externos (por exemplo, infecção bacteriana, lesão tecidual), uma vez que a inflamação decorrente do aumento da adiposidade corporal é pouco atenuada por mecanismos de resolução, como a produção de citocinas anti-inflamatórias, a redução da expressão de receptores, *feedback* negativo, entre outros (ROGERO e CALDER, 2018). Segundo HOTAMISLIGIL et al. (2006), esta inflamação é denominada inflamação metabólica ou metainflamação, a qual tem sua gênese está intimamente associada ao estilo de vida, particularmente à qualidade da dieta e à prática de atividade física.

A metainflamação é originada do aumento do volume (hipertrofia) dos adipócitos, o qual acarreta a disfunção deste tecido devido ao menor aporte de oxigênio (hipóxia), estresse do retículo endoplasmático e lipotoxicidade (GE *et al.*, 2014). A resposta inflamatória gerada no tecido adiposo, por sua vez, é mediada pelos adipócitos e, principalmente, por macrófagos residentes neste tecido, os quais passam do perfil M2, anti-inflamatório, para o perfil M1, pró-inflamatório. Estas células produzem mediadores inflamatórios como a quimiocina, MCP-1, e as moléculas de adesão, VCAM-1 e ICAM-1, as quais estimulam a migração de outras células imunes para o tecido inflamado, enquanto as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 contribuem para a progressão da inflamação ativando seus receptores celulares específicos (UNAMUNO et al., 2018)

O TNF- α , por exemplo, estimula o seu receptor (TNFR1) provocando a ativação das proteínas da família das MAPK, como a quinase regulada por sinais extracelulares (ERK), a p38 e a c-Jun N-amino-terminal (JNK), que são responsáveis pela ativação do fator de transcrição designado proteína ativadora (AP)-1 (SUGANAMI e OGAWA, 2010). Além disso, assim como a IL-1 β e IL-6, pode ativar a produção hepática de proteínas de fase aguda, como a proteína sérica amiloide A (SAA), importante biomarcador inflamatório (DE BUCK et al., 2016). Cabe destacar que a IL-6 induz o aumento da síntese hepática da proteína C reativa, proteína de fase aguda positiva, que representa o biomarcador inflamatório mais estudado e mais comumente utilizado na prática clínica, devido à sua alta estabilidade (meia vida de 19 horas) e ao seu rápido aumento no plasma em resposta ao estímulo inflamatório. O aumento da

concentração plasmática de IL-6, segundo GALLAND (2010), atua como preditor para o desenvolvimento da diabetes tipo 2 e de doenças cardiovasculares.

Além disso, a ativação de quinases da via inflamatória, como a JNK, nos adipócitos, leva a fosforilação em resíduos de serina 307 do receptor de insulina-1 (IRS-1) e, conseqüentemente, redução da sensibilidade à ação da insulina. Tal fato ocasiona perda de funcionalidade dessas células, que passam a ter menor capacidade de armazenamento (redução da adipogênese) e maior liberação de ácidos graxos não esterificados (AGNE) para a circulação sanguínea (GREGOR e HOTAMISLIGIL, 2011), os quais podem ser captados pelo fígado e armazenados na forma de triacilgliceróis ou associados às proteínas apoB 100 — constituintes das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). As VLDL sofrem ação da enzima lipase de lipoproteína (LPL), o que promove aumento da captação de AGNE pelos tecidos como músculo esquelético (VEKIC et al., 2018; LONGO et al., 2019). Após a transferência de AGL das VLDL para estes tecidos, estas se tornam menos densas denominando-se lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais podem participar do processo de aterogênese na íntima endotelial (ROCHA e LIBBY, 2009). Assim, decorrente da alteração do metabolismo lipídico, os indivíduos com sobrepeso e obesidade podem apresentar dislipidemias, ou seja, elevação das concentrações de lipoproteínas aterogênicas (VEKIC et al., 2018).

Na obesidade, também, verifica-se um quadro de disbiose intestinal, caracterizada pela maior proporção de bactérias Gram-negativas do que Gram-positivas, bem como maior concentração plasmática de lipopolissacarídeo (LPS) se comparada àquela verificada em indivíduos eutróficos (NEVES et al., 2013). O LPS é um componente estrutural integral e predominante da membrana externa de bactérias Gram-negativas, além de representar um dos mais potentes iniciadores microbianos da inflamação (DOBROVOLSKAIA e VOGEL, 2002). Estudos intervencionais agudos que analisaram os efeitos pós-prandiais de um alimento ou refeição identificaram aumento da concentração plasmática de LPS após o consumo de refeições ricas em lipídios, sendo que um dos mecanismos propostos para a ocorrência desse fato é o aumento da permeabilidade intestinal ocasionada por este tipo de refeição (GHANIM et al., 2010; MOREIRA et al., 2012; QUINTANILHA et al., 2018). Cabe mencionar que o aumento da concentração plasmática de LPS associado ao padrão alimentar é denominado endotoxemia metabólica (CANI et al., 2007).

O LPS pode ser absorvido e transportado pela proteína ligadora de LPS (*LPS-binding protein* — LBP) e, posteriormente, associar-se a proteína acessória CD14, ativando receptores do tipo toll-4 (TLR4) de diversos tipos celulares (BEUTLER e RIETSCHHEL, 2003; FUJIHARA et al., 2003). A CD14 pode também existir como uma proteína solúvel e, nesse caso, pode carrear o LPS para a superfície celular (LANDMANN et al., 2000; TRIANTAFILOU e TRIANTAFILOU, 2002).

A ativação da via de sinalização do TLR4 culmina na translocação de fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a AP-1. Após a ativação do TLR4, uma proteína quinase chave da cascata de sinalização é a TAK1, que é responsável pela ativação do complexo IKK, que é formado por IKK α , IKK β e IKK γ /NEMO. A ativação do complexo IKK resulta na fosforilação do I κ B- α , o que provoca a degradação desse inibidor, bem como favorece a translocação do NF- κ B do citoplasma para o núcleo celular e posterior ativação da transcrição de diversos genes dependentes do κ B, como genes de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6. Já no caso da AP-1, a TAK-1 ativa a JNK, a qual tem como função a adição de um grupo fosfato em uma das subunidades deste fator de transcrição, possibilitando seu deslocamento para o núcleo (BEUTLER e RIETSCHHEL, 2003; BEUTLER, 2004; KAWAI e AKIRA, 2005). A ativação da AP-1 resulta na ativação transcricional de genes envolvidos com ativação dos linfócitos T, apoptose e remodelamento da matriz extracelular, os quais estão relacionados com a progressão da inflamação (ZENZ et al., 2008; YE et al., 2014).

Estudos da expressão gênica de proteínas envolvidas na via inflamatória do TLR-4/NF- κ B/AP-1 mostraram que os microRNA (miRNA), pequenos RNA não-codificantes, possuem papel importante na sua regulação e suas concentrações podem ser alteradas em diferentes condições patológicas, como na obesidade (QUINTANILHA et al., 2017).

Os miRNA são constituídos por, aproximadamente, 22 nucleotídeos, e sua formação ocorre a partir da transcrição — por meio da RNA polimerase II (via canônica) — de seus genes que estão localizados em diversas regiões do DNA. A sua síntese inicial tem como produto o miRNA primário (pri-miRNA), que recebe um resíduo metilado de guanilato (cap) e uma cauda poli-A. Mas, também, podem ser oriundos da formação direta do pré-miRNA após *splicing* realizado pelos

spliceossomos de mRNA transcritos, os quais são designados Mirtrons (LEE et al., 2004; KIM e NAM, 2006; WAHID et al., 2010; WESTHOLM e Lai, 2011).

Na biogênese canônica, após a transcrição, o pri-miRNA, no núcleo, é clivado pela enzima Drosha (RNase III) associada à proteína ligante DGCR8 dando origem ao pré-miRNA. Este, posteriormente, é exportado para o citoplasma por meio da Ran-GTP exportina-5, onde a enzima Dicer (RNase III) removerá o laço do grampo do pré-miRNA, gerando duas fitas de RNA pareadas (miRNA:miRNA*) com, aproximadamente, 22 nucleotídeos (CARTHEW e SONTHEIMER, 2009).

As duas fitas de miRNA pareadas são, então, reposicionadas pela proteína TRBP na Dicer, permitindo, assim, a ligação com a proteína Argonauta (AGO) do complexo-RNA de indução de silenciamento (RISC), que se encontra em uma conformação aberta devido à ação da chaperona HSP 90 (MEISTER, 2013).

A nomenclatura dos miRNA pode conter a terminação “5p” e “3p”, pois acreditava-se que a fita originada da terminação 5’ do DNA era aquela à qual se associava ao complexo RISC para exercer sua função e, por isso, também, denominada fita “madura”. Enquanto, a fita gerada na terminação 3’, “passageira”, era desacoplada pela endonuclease C3PO para sua posterior degradação (YE et al., 2011). Todavia, estudos observaram que ambas as fitas de miRNA podem exercer papel biológico (YANG e LAI, 2011; HAMMOND, 2015).

Acoplado ao complexo RISC, o miRNA parecia de forma total (raro em animais) ou parcial com a sequência *seed* da fita do mRNA alvo. A sequência *seed* é composta por 2 a 8 nucleotídeos, localizados na região 5’ do miRNA, e liga-se à região 3’ não traduzida (3’ UTR) complementar do mRNA alvo, podendo, também, se ligar às regiões 5’UTR e codificadora do mRNA, interferindo no processo de *splicing* (TAY et al., 2008; AMERES e ZAMORE, 2013; GUO et al., 2014).

Dessa forma, os miRNA podem regular a expressão gênica por mecanismos pós-transcricionais por meio de diferentes mecanismos: clivagem do mRNA pela AGO2, bloqueio da tradução, desestabilização do mRNA pela deadenilação e/ou retirada do *cap* e recrutamento de cofatores que podem interferir na tradução (AMERES e ZAMORE, 2013). Além disso, estudos mostram que os miRNA podem aumentar a expressão gênica por meio da sua interação com a região promotora de genes. Dois potenciais mecanismos foram descritos a partir da descoberta da presença de miRNA maduros e do complexo RISC no núcleo de células. O primeiro

deles envolve o pareamento e posterior degradação de outros RNA, como os RNA longos não-codificantes (lncRNA) e RNA promotores não-codificantes (pRNA), os quais são responsáveis pelo recrutamento de complexos repressores da transcrição. O segundo, é pelo recrutamento de complexos ativadores da transcrição independente da degradação de outros RNA (CATALANOTTO et al., 2016; PAUGH et al., 2016).

A importância da regulação da expressão gênica por meio de miRNA destaca-se pelo fato que um único miRNA pode atuar em diversos genes-alvo, bem como um mesmo mRNA pode parear com diferentes miRNA. Assim, segundo FRIEDMAN et al. (2009), mais de 60% dos genes humanos podem ser regulados por miRNA.

Outra característica relevante dos miRNA é que eles podem atuar de forma endócrina, pois alguns são liberados no meio extracelular pela sua associação a exossomos (pequenas vesículas extracelulares de origem endossomal), microvesículas, lipoproteínas ou ribonucleoproteínas, que os protegem da degradação por RNAses. Por isso, podem ser encontrados em fluidos biológicos como sangue, urina, saliva, leite materno e sêmen (WEBER et al., 2010). Grande parte dos miRNA é transportada por exossomos e, segundo alguns autores, alguns miRNA são, preferencialmente, selecionados pela célula de origem para serem transportados por estas pequenas vesículas. Assim, os miRNA presentes em exossomos possuem papel importante na progressão de inúmeras doenças (ZHANG et al., 2015; AGHABOZORGI et al., 2019).

Aliado a este fato, por serem resistentes à ação de RNAses, estáveis ao aquecimento, às alterações de pH e à estocagem em longo prazo, e apresentarem perfil diferente na condição saúde/doença, atualmente, estudos voltados a detecção de miRNA como biomarcadores têm sido desenvolvidos (TIJSEN et al., 2012; KONDKAR e ABU-AMERO, 2015).

Neste sentido, estudos mostram que indivíduos com obesidade possuem perfil de expressão de miRNA diferente daquele verificado em indivíduos eutróficos, indicando o possível papel destes RNA na modulação da adipogênese, lipólise, metabolismo lipídico e da glicose, hipóxia, inflamação e secreção de adipocinas (LORENTE-CEBRIÁN et al., 2019). As alterações no tecido adiposo branco promovidas pelo desbalanço do consumo energético, estimulam a produção e liberação de microvesículas contendo miRNA pelos adipócitos, que, desta forma,

possibilitaria a regulação da função de outros tipos celulares, como hepatócitos e PBMC (VALADI et al., 2007; DENG et al., 2009; THOMOU et al., 2017). DE SILVA et al. (2018) mostraram que os adipócitos também podem ter a expressão de genes relacionados à inflamação alterada quando submetidos ao tratamento com exossomos, derivados de macrófagos, contendo miRNA. Neste mesmo estudo, a ativação de macrófagos com LPS reduziu o conteúdo de miR-143 nestas microvesículas.

O miR-143 é expresso no coração, timo, rins e, principalmente, no tecido adiposo branco. Sua expressão está correlacionada positivamente ao IMC e a presença da síndrome metabólica (TAKANABE et al., 2008; XIHUA et al., 2019). Entretanto, no sentido oposto, alguns estudos mostram menor expressão deste miRNA em obesos quando comparada ao de eutróficos, o que poderia estar associado a presença de um quadro inflamatório naqueles indivíduos, visto que sua expressão é reduzida pela citocina pró-inflamatória, TNF- α , e, pelas adipocinas, leptina e resistina, e pelos AGL, cujas concentrações são elevadas no quadro da obesidade (XIE et al., 2009; ZHU et al., 2011; KILIC et al., 2015). Cabe ressaltar que o miR-143 tem como alvo da cascata inflamatória do TLR-4/NF-kB/AP-1, a TAK-1, ponto chave na sinalização desta via. E é por este motivo que alguns autores sugerem um possível mecanismo de feedback negativo exercido por este miRNA (ZHU et al., 2013; HUANG et al., 2017). Em relação ao metabolismo da glicose, o aumento da sua expressão está associado ao desenvolvimento do diabetes tipo 2 em obesos, pois é prejudicial à homeostase glicêmica e à sensibilidade à ação da insulina no fígado. O mecanismo descrito que explicaria esta associação é a inibição da proteína relacionada à proteína de ligação ao oxisterol (ORP)-8 pelo miR-143 e, conseqüentemente, redução da fosforilação da AKT (TAKANABE et al., 2008; JORDAN et al., 2011).

Outro miRNA cuja expressão é alterada na obesidade é o miR-146a. HIJMANS et al. (2018) a partir de uma amostra de 45 indivíduos (eutróficos, com sobrepeso e obesos) verificaram redução de, aproximadamente, 65% na expressão plasmática dos miR-146a, miR-150 e miR-126 nos indivíduos com excesso de peso quando comparado aos eutróficos.

O miR-146a-5p apresenta ação anti-inflamatória por ter como alvos duas proteínas, o receptor de TNF associado ao fator 6 (TRAF6) e o receptor de interleucina 1 associado à quinase 1 (IRAK1), que participam da ativação do NF-kB e da AP-1

(IYER et al., 2012; GAO et al., 2018; WANG et al., 2018). Assim, sua redução correlaciona-se com a presença de diversas condições fisiopatológicas em indivíduos obesos, como a doença hepática gordurosa não alcoólica (MEHTA et al., 2016; ALIPOOR et al., 2017).

Sabendo dos efeitos dos miRNA sobre diversos aspectos relacionados ao excesso de peso e suas comorbidades associadas, estudos focados em utilizar mímicos destas moléculas como possíveis meios terapêuticos vêm crescendo. Entretanto, devido à inespecificidade da ação dos miRNA — uma vez que apresentam diversos mRNA alvos — e aos possíveis efeitos adversos atribuídos à toxicidade na sua manipulação como agentes terapêuticos, os pesquisadores, para contornar este problema, veem os nutrientes e compostos bioativos como uma estratégia para modulação da expressão dos miRNA no excesso de peso. Surge, então, o termo “Nutrimiromics”, ciência que estuda a interação entre dieta, nutrientes e compostos bioativos e a expressão de miRNA, a qual pode influenciar o risco para o desenvolvimento das DCNT (QUINTANILHA et al., 2017).

Dentre os compostos bioativos mais estudados, são os polifenóis devido a sua abundância em uma grande variedade de alimentos, como frutas e hortaliças. Podem ser classificados de acordo com sua estrutura química: ácidos fenólicos (hidroxicinâmico e ácido hidroxibenzóico), flavonóides (flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonas), estilbenos, cumarina e taninos (BLADÉ et al., 2013; MILENKOVIC et al., 2013).

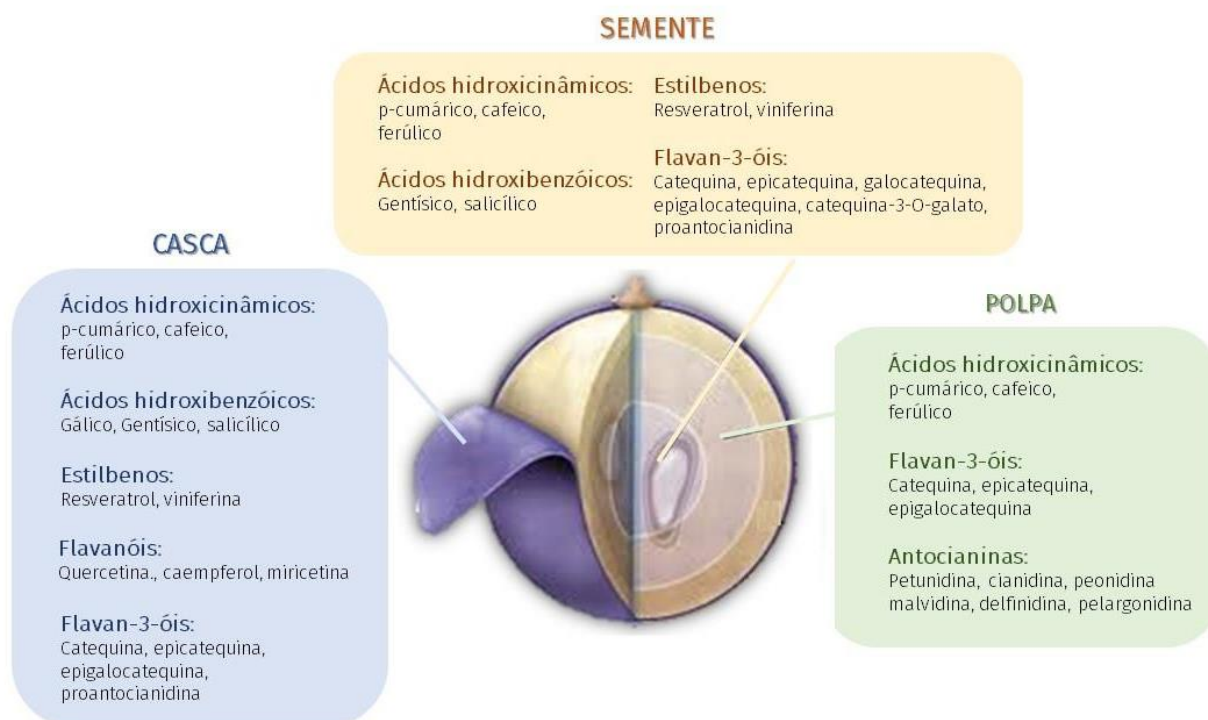
O elevado consumo de polifenóis por meio da alimentação tem sido associado à redução do risco de DCNT. Isso pode ser explicado devido a inúmeras ações atribuídas a estes compostos no organismo, como diminuição da resistência à ação da insulina, modulação do metabolismo lipídico, redução da concentração plasmática de LDL-c, melhora da função endotelial, redução da pressão arterial e da agregação plaquetária e regulação da via inflamatória (BLADÉ et al., 2013; MILENKOVIC et al., 2013).

Atualmente, evidências indicam que os polifenóis, além do seu papel antioxidante, podem regular a expressão gênica por meio da modulação de mais de 100 miRNA envolvidos em diferentes processos celulares, como a resposta inflamatória (MILENKOVIC et al., 2013; CURTI et al., 2014; JOVEN et al., 2014). Apesar dos mecanismos ainda não estarem totalmente elucidados, sugere-se que os

polifenóis possam interferir no pareamento entre os miRNA e seus mRNA alvos, bem como, ligar a componentes envolvidos na biogênese destes pequenos RNA, como a Dicer ou o complexo RISC (BASELGA-ESCUADERO et al., 2013; BLADÉ et al., 2013; LATRUFFE et al., 2015).

A uva (*Vitis sp.*) e seus derivados estão entre as maiores fontes de polifenóis em relação a outras frutas e hortaliças. No Brasil, a espécie de uva mais cultivada é a *Vitis labrusca* que, segundo COSME et al. (2018), apresenta maior quantidade de compostos fenólicos e capacidade antioxidante *in vitro* em comparação à espécie européia, *Vitis vinifera*, usada preferencialmente para produção de vinhos. Nas uvas, os fenólicos se distribuem em diferentes partes do fruto, sendo a casca sua principal fonte, seguido das sementes e da polpa. Quando os sucos de uva tintos são produzidos, a polpa é aquecida juntamente com a casca e a semente, o que resulta na maior incorporação de compostos fenólicos ao suco (**Figura 1**) (FULEKI e RICARDO-DA-SILVA, 2003).

Figura 1 – Composição de compostos fenólicos nas diferentes partes da uva.



Fonte: adaptado de Cosme et al. (2018).

Os principais compostos fenólicos presentes no suco de uva são antocianinas, flavan-3-óis, flavanóis, ácidos fenólicos e resveratrol (NATIVIDADE et al., 2013).

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é uma fitoalexina composta por dois anéis fenólicos ligados por uma dupla ponte, podendo estar na conformação *cis*- ou *trans*-, dependendo da posição de sua hidroxila, sendo o *trans*-resveratrol mais estável. Na alimentação, pode ser encontrado nas uvas (de 0,19 a 0,90 mg/L de *trans*-resveratrol), frutas vermelhas, amendoim e jaca (SAUTTER et al., 2005). Diversos efeitos benéficos têm sido atribuídos a este flavonoide em indivíduos com excesso de peso, como controle da ingestão alimentar e absorção de nutrientes, modulação do ciclo celular de adipócitos e da função mitocondrial, atenuação do processo inflamatório e alteração da microbiota intestinal (PAN et al., 2018).

Em relação ao papel do resveratrol no processo inflamatório, estudos mostram a regulação da expressão gênica por meio da ação de miRNA, como demonstrado por TILI et al. (2010), que, após tratamento de monócitos humanos (THP-1) com 30 ou 50 μ M de resveratrol, durante 14 horas, observaram aumento da expressão do miR-663, cujo alvo é o fator de transcrição pró-inflamatório designado AP-1 (**Quadro 1**). O miR-let-7a, também, teve sua expressão elevada após tratamento com este polifenol, o que levou a redução da expressão gênica do TNF- α e da IL-6 e aumento da IL-10 mesmo após o estímulo destas células com LPS (SONG et al., 2016). LI et al. (2013) também verificaram o efeito anti-inflamatório do resveratrol em células cancerígenas, onde este reduziu a expressão do miR-21 e, conseqüentemente, a fosforilação do I κ B e atividade do NF- κ B. Já em macrófagos (RAW 264.7), este polifenol modulou positivamente a expressão do fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2), o qual tinha sua tradução reduzida pelo miR-146a (BIGAGLI et al., 2017). O Nrf2 tem papel importante na inflamação mediada por NF- κ B, pois compete com este fator de transcrição pelo mesmo coativador CBP, que, quando associado ao Nrf2, ativa a transcrição de diversas enzimas antioxidantes por sua ligação ao elemento de resposta à antioxidantes (ARE) (AHMED et al., 2017).

Em humanos, os estudos de intervenção com este polifenol e seus efeitos na modulação de miRNA são escassos. TOMÉ-CARNEIRO et al. (2013), em um estudo randomizado placebo controlado, verificaram aumento da expressão dos miR-21, -181b, -663 e 30c2, e redução do miR-155 e 34a após tratamento de 35 homens

diabéticos e hipertensos com extrato de uva contendo 8 mg de resveratrol durante 1 ano. Segundo o autor, estes miRNA estão envolvidos com o processo inflamatório. LÉNIZ et al. (2021) verificaram, em um estudo com 23 indivíduos com diagnóstico de síndrome metabólica, que a ingestão de 8 g de extrato de bagaço de uva, por 6 semanas, reduziu a expressão plasmática do miR-222 e -30c no grupo categorizado como respondedores. Ambos os miRNA possuem alvos relacionados ao metabolismo de carboidratos, promovendo a captação de glicose e ativação da glicólise quando reduzidos. O miR-222 também teve menor expressão plasmática em 21 indivíduos saudáveis, os quais consumiram 5 g/kg de peso corporal de uva fresca, após 21 dias de ingestão. Outros 17 miRNA foram regulados negativamente com a ingestão da fruta, enquanto 2 miRNA foram regulados positivamente. A análise de enriquecimento de vias de sinalização realizada pelos autores verificou correlação dos potenciais alvos desses miRNA com o processo inflamatório e a oncogênese (TUTINO; DE NUNZIO; MILELLA; GASPARRO *et al.*, 2021).

Assim, sabendo que os miRNA podem ser regulados por nutrientes e compostos bioativos, e que a alimentação é um dos fatores de risco modificáveis para prevenção e tratamento das DCNT, ressalta-se a importância de mais estudos acerca dos mecanismos pelos quais estes compostos podem auxiliar na redução da prevalência destas comorbidades.

Quadro 1 – Modulação de miRNA por compostos presentes na uva.

Composto da uva	Dose	Modelo experimental	miRNA	Regulação da expressão	Ponto-final da modulação	Ref.
<i>In vitro</i>						
Proantocianidinas da semente de uva	25 µg/mL	Monócitos	miR-9	↑	Redução da aterogênese	(SHAO et al., 2020)
Resveratrol	50 µM	Monócitos	miR-663 miR-155	↑ ↓	Redução da inflamação crônica	(TILI et al., 2010)
	1-20 µM	Macrófagos	miR-155	↓	Redução da inflamação induzida por LPS	(MA et al., 2017)
	10µM	Macrófagos	miR-146a	↓	Redução da inflamação induzida por LPS	(BIGAGLI et al., 2017)
	25-200 µM	Monócitos	miR-let-7a	↑	Redução da inflamação induzida por LPS	(SONG et al., 2016)
	10-100 µM	Astrócitos	miR-21	↓	Redução da inflamação	(LI et al., 2013)
	80-100 µM	Células endoteliais	miR-221/222	↑	Redução da inflamação induzida por TNF-α	(LIU et al., 2017)
GSPE e extrato do bagaço de uva	25 mg/L	Hepatócitos	miR-122 miR-33a	↓	Redução do risco de doenças metabólicas	(BASELGA-ESCUDEIRO et al., 2013)
Extrato de vinho tinto	25-100 µg GAE/mL	Miofibroblastos	miR-126	↑	Redução da inflamação	(ANGEL-MORALES et al., 2012)

Quadro 1 – Modulação de miRNA por compostos presentes na uva (*continuação*).

Composto da uva	Dose	Modelo experimental	miRNA	Regulação da expressão	Ponto-final da modulação	Ref.
<i>In vivo</i>						
Resveratrol	5 mg/kg/d	Ratos	miR-20b	↑	Redução da aterogênese	(MUKHOPADHYAY et al., 2012)
	30 mg/kg/d	Ratos	miR-539-5p	↑	Redução da lipogênese <i>de novo</i>	(GRACIA et al., 2016)
	30 mg/kg/d	Ratos	miR-103-3p miR-107-3p miR-122-5p	↓	Redução da NAFLD	(GRACIA et al., 2017)
GSPE	30 mg/kg/d	Ratos	miR-33a miR-122	↓	Aumento da adiponectina e atividade antioxidante	(MOHAMED et al., 2016)
	5-50 mg/kg/d	Ratos	miR-33a miR-122	↓	Redução da dislipidemia e gordura no fígado	(BASELGA-ESCUDERO et al., 2015)
	250 mg/kg/d	Ratos	miR-33a miR-122	↓	Redução do efluxo do colesterol por hepatócitos	(BASELGA-ESCUDERO et al., 2012)
Mix de antocianinas, flavonóis, e derivados de ácidos fenólicos	---	LDL ^{r/-} camundongos	miR-103 miR-107 miR-122	↓	Redução da esteatose hepática Redução da resistência à ação da insulina	(JOVEN et al., 2012)

Quadro 1 – Modulação de miRNA por compostos presentes na uva (*continuação*).

Composto da uva	Dose	Modelo experimental	miRNA	Regulação da expressão	Ponto-final da modulação	Ref.
<i>Clinical Trials</i>						
Bagaço de uva (<i>Vitis vinifera</i> L.) liofilizado	8 g/d	Indivíduos com síndrome metabólica	miR-222 miR-30c	↓	Melhora do controle glicêmico	(LÉNIZ et al., 2021)
Uva	5 g/kg	Indivíduos saudáveis com sobrepeso	miR-208a-3p miR-33a-5p	↑	Alvos envolvidos no processo inflamatório, oncogênese e metabolismo	(TUTINO et al., 2021)
			miR-181a-5p miR-30e-5p miR-30d-5p miR-335-5p miR-222-3p miR-15a-5p miR-421 miR-339-5p miR-378a-3p let-7f-5p miR-29b-3p miR-106b-3p miR-324-5p miR-1260a miR-155-5p miR-335-3p miR-200c-3p	↓		
Cápsula de extrato de resveratrol	350 mg/d	Indivíduos hipertensos com DM2	miR-21 miR-181b miR-663 miR-30c2	↑	Redução da inflamação	(TOMÉ-CARNEIRO et al., 2013)

			miR-34a miR-155	↓		
--	--	--	--------------------	---	--	--

Nota: GSPE – proantocianidinas de sementes de uva (do inglês, *grape seed proanthocyanidins*)

2 JUSTIFICATIVA

As DCNT são a principal causa de morte no mundo, entretanto, caracterizam-se por estarem associadas a fatores de risco que podem ser modificados, como a alimentação. Segundo dados da BRASIL (2017), o hábito alimentar brasileiro tem sofrido modificações com o decorrer dos anos, onde aumentou-se o consumo de alimentos ricos em gorduras, açúcares e sódio, sendo assim, associado ao crescimento do número de mortes e enfermidades devido às DCNT. A ingestão diária de frutas e hortaliças contribui para redução do risco e tratamento destas comorbidades, sendo que muitos estudos mostram o papel de seus nutrientes e compostos bioativos modulando a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento das DCNT (BOEING et al., 2012; VAN BREDA e DE KOK, 2018).

De acordo com a literatura, o suco de uva apresenta diversos efeitos benéficos na saúde humana, em destaque para suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, que estão relacionados à presença de uma variedade de compostos bioativos, em destaque, os compostos fenólicos (COSME et al., 2018). Entretanto, quando se trata do seu consumo e a expressão de miRNA, não estão claros os mecanismos pelos quais o suco de uva pode contribuir para a redução do risco e tratamento destas doenças.

Assim, aliado ao fato de o suco de uva ser uma bebida de fácil acesso pela população, este estudo propõe investigar se a ingestão crônica de suco de uva integral poderia modular, em mulheres com sobrepeso, a expressão de miRNA plasmáticos e em PBMC envolvidos com a resposta inflamatória a fim de auxiliar nas escolhas alimentares para mitigação dos riscos relacionados ao desenvolvimento de DCNT.

3 HIPÓTESE

O suco de uva pode atenuar a resposta inflamatória crônica e de baixa intensidade e modular a expressão de microRNA no plasma e em PBMC em mulheres com sobrepeso.

4 OBJETIVO

Investigar o efeito da ingestão de suco de uva integral sobre a expressão de microRNA no plasma e em células mononucleares do sangue periférico e sua relação com a resposta inflamatória, em mulheres com sobrepeso.

5 MÉTODOS

O presente estudo é intervencional e crônico.

5.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população do estudo foi composta por mulheres, com idade entre 18 e 40 anos e IMC entre 25,0 e 29,9 kg/m² (sobrepeso) (OMS, 1995). O número de participantes foi calculado para fornecer um poder estatístico de 80% ($\beta = 20\%$), com o intuito de detectar uma diferença de 30% na redução da concentração plasmática de TNF- α após a ingestão crônica do suco de uva integral, considerando um valor de α de 5% bilateral. Neste sentido, foi estimado um tamanho de amostra de 19 indivíduos para testar a hipótese primária relacionada à concentração plasmática de TNF- α . Todavia, considerando um percentual médio de 25% de desistência de participação no protocolo experimental por parte das voluntárias, foi adotado um tamanho de amostra de 24 indivíduos ($n = 24$).

As participantes foram recrutadas por meio de cartazes e anúncios em redes sociais (Anexo 1), sendo as interessadas convocadas para uma entrevista, no Centro de Saúde Escola Geraldo de Paula Souza (CSEGPS), localizado ao lado da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, na Avenida Dr. Arnaldo, 925, onde receberam instruções a respeito do delineamento do estudo, sendo esclarecidas as dúvidas e aplicado um questionário para a caracterização e a confirmação da adequação das interessadas quanto aos critérios de inclusão e não inclusão (Anexo 2).

Os critérios de inclusão foram: (a) sexo feminino; (b) idade entre 18 e 40 anos; (c) IMC entre 25,0 e 29,9 kg/m²; (d) estar disposta a aderir ao protocolo de estudo; e (e) estar disposta a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os critérios de não inclusão foram: (a) sexo masculino; (b) idade inferior a 18 anos e superior a 40 anos; (c) IMC < 25,0 kg/m² ou $\geq 30,0$ kg/m²; (d) ser atleta; (e) diagnóstico de diabetes melito; (f) fazer uso de medicação prescrita para controlar inflamação, perfil lipídico plasmático, glicemia e pressão arterial sistêmica; (g) fazer uso de suplemento nutricional; (h) hábito de consumo frequente de suco de uva; (i) ser

tabagista; (j) possuir algum problema gastrointestinal crônico (por exemplo, doença inflamatória intestinal, doença celíaca, câncer); (k) estar gestante; (l) estar participando de outro estudo; e (m) estar seguindo dieta alimentar específica (por exemplo, dieta para emagrecimento ou ganho de massa corporal). Durante o protocolo experimental, foram utilizados os seguintes critérios de exclusão: valores de hemoglobina inferior a 12,0 g/dL, não ingestão do suco de uva integral na frequência e quantidade indicada no estudo, uso de medicação prescrita para controlar inflamação, perfil lipídico plasmático, glicemia e pressão arterial sistêmica, uso de suplemento alimentar, gravidez ou qualquer tipo de reação adversa após a ingestão do suco de uva.

As interessadas que atenderam os critérios de inclusão e aceitaram participar do estudo, receberam e assinaram o TCLE (Anexo 3). Em seguida, foram agendadas três datas para a colheita de sangue, com intervalo de 2 semanas, ou seja, cada participante foi seu próprio controle. Além disso, as voluntárias foram orientadas a não praticarem exercício físico no período de 48 horas anteriores à colheita de sangue, bem como não ingerirem bebida alcoólica 1 semana antes e ficar em jejum 12 horas antes da colheita de sangue. Todas essas informações foram disponibilizadas por meio de um cronograma entregue às voluntárias (Anexo 4).

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (CAAE: 69382117.6.0000.5421) e registrado na plataforma de Registro brasileiro de ensaios clínicos (ReBEC) (UTN code: U1111-1241-0556).

5.1.1 Caracterização das participantes

A massa corporal foi aferida utilizando balança de plataforma digital, com precisão mínima de 100 g. O equipamento foi posicionado em superfície lisa e nivelada. A estatura foi aferida em estadiômetro com precisão de 0,5 cm. A participante foi avaliada descalça, ereta e sem adornos e acessórios. As medidas foram realizadas duas vezes e o valor considerado foi a média entre elas. A partir dos dados de massa corporal e estatura, foi calculado o índice de massa corporal (IMC) e classificado segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 1995). As circunferências da cintura e do quadril foram aferidas utilizando uma fita métrica

flexível e inelástica. A circunferência da cintura foi medida com a voluntária ereta, braços relaxados ao lado do corpo, pés juntos e abdômen relaxado e a região medida estava livre de roupas. O ponto de medição utilizado foi o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. A circunferência do quadril foi aferida no maior perímetro da região glútea, estando a voluntária em posição ereta e pés unidos. A pressão arterial foi aferida em um monitor digital de pressão arterial automático para braço da marca Omron HEM-7113 (Omron Corporation, Kyoto, Japão) com a voluntária sentada e com o braço direito apoiado, sendo o resultado obtido pela média entre três medidas.

5.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

As colheitas de sangue e as coletas de dados foram realizadas no Centro de Saúde Escola Geraldo de Paula Souza, no período de agosto de 2017 a junho de 2018, participando cada uma das voluntárias em três dias denominados: basal (período inicial antes da ingestão de suco), 2 semanas e 4 semanas após o início da ingestão do suco de uva. Nesses três momentos, foram aferidas a pressão arterial e a glicemia de jejum capilar por meio do sistema de monitorização de glicemia da marca Accu-Chek® Active (Roche, Basel, BS, Suíça). Em seguida, foram coletados 30 mL de sangue e oferecido o desjejum para a voluntária. Todas as colheitas de sangue foram posteriores ao jejum alimentar de 12 horas. Além disso, foram aferidas a massa corporal e as circunferências da cintura e do quadril, bem como foi aplicado um recordatório alimentar de 24 horas (Anexo 5) (SELEM et al., 2014). A ingestão de macro e micronutrientes foi analisada por meio do *software* online Dietbox.

No momento basal, cada voluntária recebeu duas garrafas de suco de uva, o que correspondia ao consumo diário de 500 mL de suco durante 2 dias. Posteriormente, foi entregue, em domicílio, o número restante de garrafas de suco para completar a ingestão correspondente ao período de 2 semanas de intervenção. O mesmo procedimento ocorreu após 2 semanas no que concerne ao fornecimento de garrafas. A última colheita de sangue foi realizada no dia posterior à ingestão da última garrafa de suco, completando 4 semanas de intervenção (Figura 2).

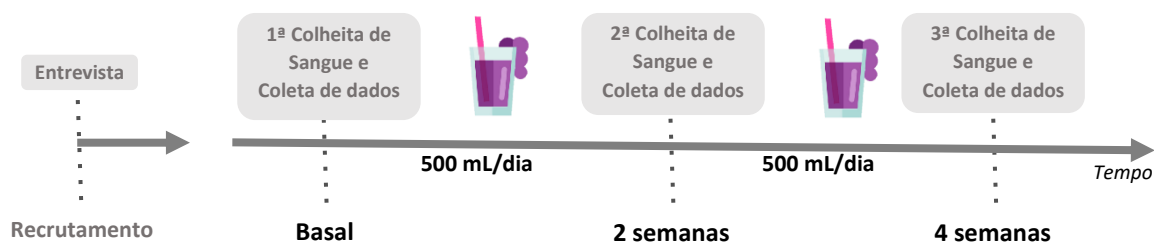


Figura 2 - Delineamento do estudo.

Vale ressaltar que não houve recomendações quanto ao horário de ingestão do suco de uva pelas voluntárias, apenas recomendou-se que esta fosse fracionada durante o dia, correspondendo ao total de 500 mL (uma garrafa). No domicílio, os sucos deveriam ser armazenados ao abrigo de luz, podendo ou não resfriados antes do seu consumo.

5.3 SUCO DE UVA INTEGRAL

O suco de uva integral foi escolhido a partir da análise prévia do espectro de compostos fenólicos de seis marcas comerciais obtidas em estabelecimentos do ramo alimentício. Como critério de escolha da marca comercial, foi avaliada a marca que continha maior quantidade de fenólicos totais e perfil mais variado entre os compostos detectados. O suco de uva integral escolhido no estudo em tela foi produzido e envasado na serra Gaúcha, a partir das espécies de uva Bordô, Concord, Isabel e Violeta.

De acordo com a tabela nutricional apresentada no produto, o suco apresenta a seguinte composição nutricional (**Tabela 1**):

Tabela 1 - Composição nutricional do suco de uva.

Composição nutricional	Rótulo (100 mL)	Estudo (500 mL)
Calorias (kcal)	73	365
Carboidratos (g)	17	85
Açúcares (g)	14,5	72,5

Um único lote de suco de uva integral, sem adição de água, açúcar e conservantes, foi adquirido. Após o recebimento das garrafas de suco, estas foram armazenadas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz no Laboratório de Genômica Nutricional e Inflamação (GENUIN) da Faculdade de Saúde Pública da USP durante todo o estudo.

5.3.1 Caracterização do suco de uva integral

As amostras do suco foram analisadas em triplicata nos seguintes parâmetros:

a) Açúcares totais

Amostras do suco de uva foram filtradas em filtros PTFE (Millipore Ltda., Bedford, USA) de 0,45 µm de poro e, posteriormente, analisados por CLAE acoplado a um detector pulso amperométrico (Dionex, DX500, Sunnyvale, CA, USA). Foi utilizado uma coluna PA1 (250 x 4 mm, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) e fase móvel constituído de NaOH 18 mM, em modo isocrático, por 25 min. O fluxo através da coluna foi de 1 mL/min. As amostras foram injetadas em duplicata e os açúcares identificados pelo tempo de retenção em comparação a padrões externos de sacarose, frutose e glicose (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) foram utilizados para a construção de uma curva de calibração com cinco pontos de concentração e aplicados em triplicata (Gomez et al., 2002). Os resultados foram expressos como g/100 mL de suco (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Teor de açúcares do suco de uva em 100 mL e 500 mL.

Teor de açúcares	Quantidade	
	100 mL	500 mL
Açúcares totais (g)	13,8	68,9
Glicose (g)	6,4	31,8
Frutose (g)	7,4	37,1
Sacarose (g)	0,0	0,0

O teor de sólidos solúveis foi avaliado com refratômetro digital portátil (modelo DR 201-95) (Krüss Optronic, Hamburgo, Alemanha).

b) Fenólicos Totais

O teor de fenólicos totais foi quantificado de acordo com o método descrito por (SINGLETON E ROSSI, 1965), adaptado para microplaca. Em microplaca de poliestireno transparente com 96 cavidades, foram adicionados 120 μ L do suco convenientemente diluído em água. Em seguida, foram adicionados 50 μ L do reagente de Folin-Ciocalteu diluído com água na proporção de 1:5 (v:v) e a placa foi agitada e incubada em temperatura ambiente, por 3 minutos. Após a incubação, foram adicionados 30 μ L de carbonato de sódio 200 g/L e a placa foi novamente agitada e incubada a 37 °C por 1 hora. A coloração azul resultante da reação foi medida em espectrofotômetro Molecular devices (SPECTRAmax, California, Estados Unidos) em 765 nm. Os valores obtidos foram calculados utilizando uma curva de calibração elaborada com ácido gálico. Os valores finais foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico/100 mL de suco (mg EAG/100 mL de suco).

A concentração de fenólicos totais do suco de uva utilizado no estudo foi de 235,6 mg EAG/100 mL de suco. Desse modo, constata-se que as voluntárias consumiram 1178,0 mg EAG por dia por meio da ingestão de 500 mL de suco.

c) Determinação de antocianinas no suco de uva integral

Para purificação de flavonoides, utilizou-se extração em fase sólida (SPE). Uma alíquota de suco foi aplicada em coluna de poliamida (CC 6, Macherey-Nagel, Germany) (1 g/6 mL) previamente condicionada com 20 mL de metanol e 50 mL de água deionizada (MilliQ). Impurezas foram removidas da coluna com 20 mL de água deionizada e os flavonoides retidos foram eluídos com 50 mL de metanol contendo 0,3% de ácido clorídrico. O fluxo da coluna foi controlado por manifold Visiprep 24 DL (Supelco, Bellefonte, PA). As amostras foram evaporadas em rotaevaporador, sob vácuo, a 40 °C, até secura completa. A amostra foi ressuspensa em metanol/ácido acético (95:5, v/v), filtradas em filtro de seringa PTFE 0,20 µm para o vial e injetada em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A análise foi realizada utilizando-se um sistema Agilent 1260 Infinity LC (Santa Clara, EUA) equipado com bomba de solventes quaternária e desgaseificador, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD). A coleta e análise de dados foi realizada utilizando-se o software OpenLab CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). As condições cromatográficas foram adaptadas de (RIBEIRO; NUNES, 2008). A detecção dos compostos foi realizada em 525 nm. A coluna utilizada foi Prodigy ODS3 250 x 4,6 mm; 5 µm (Phenomenex) mantida em temperatura ambiente. O volume de injeção foi de 5 µL e o fluxo de 0,8 mL/min. As fases móveis foram compostas por a) água: ácido fórmico: acetonitrila (96:1:3, v/v/v) e b) água: ácido fórmico: acetonitrila (48:1:51, v/v/v). O gradiente utilizado na separação dos compostos foi 0-10 min: 10% B, 10-15 min: 25% B, 15-20 min: 31% B, 20-30 min: 40% B, 30-40 min: 50% B, 40-45 min: 100% B, 45-50 min: 10% B. As concentrações de antocianinas no suco de uva podem ser visualizadas na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Concentração de antocianinas no suco de uva em 100 mL e 500 mL.

Antocianina	Quantidade (mg)	
	100 mL	500 mL
Delfinidina-3-glicosídeo	8,48	42,40
Malvidina-3-glicosídeo	2,32	11,60
Petunidina-3-glicosídeo	1,91	9,55
Cianidina-3-glicosídeo	1,46	7,30
Peonidina-3-glicosídeo	1,02	5,10

d) Teste da capacidade de absorvância de radical oxigênio (ORAC)

O método utilizado foi o descrito por OU et al. (2001) e PRIOR et al. (2003), com modificações. Em microplaca FLUOTRAC 200, com 96 cavidades (fundo plano, cor preta, Greiner Bione Brasil), foram pipetados 50 µL de amostra diluída em tampão fosfato (75 mol. L⁻¹, pH 7,4), 150 µL de fluoresceína (93,54 n mol. L⁻¹) e 50 µL de AAPH (221 mmol. L⁻¹).

A fluorescência foi mensurada a 37 °C, com excitação de 493 nm e emissão de 515 nm, durante 60 minutos, a cada 5 minutos, utilizando-se o leitor de placas (modelo Spectra Max M5, Molecular Devices Inc., California, Estados Unidos). Para o cálculo da capacidade antioxidante das amostras foi elaborada a curva de calibração com o padrão Trolox (400 µ mol. L⁻¹) em seis concentrações diferentes. Para as soluções (branco, Trolox, amostras) determinou-se a área sob a curva (AUC) pela equação:

$$AUC = (0,5 + F5/ F0 + F10/ F0 + F15/ F0 + ...+ F60/ F0) \times 1.$$

A capacidade antioxidante da amostra é calculada a partir da medida da área sob a curva de decaimento da fluorescência comparada ao padrão. Os resultados obtidos foram expressos em equivalentes de Trolox (µmolar EqT/ 100mL de suco).

De acordo com os resultados obtidos, o suco de uva apresentou 234,35 µmolar EqT/ 100mL. Portanto, em 500 mL de suco de uva — quantidade diária ingerida pelas voluntárias —, há 1171,75 µmolar EqT.

5.4 COLETA DE SANGUE E SEPARAÇÃO CELULAR

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos sem anticoagulante com gel de separação, contendo anticoagulante EDTA K₃, e citrato de sódio. Após a colheita, o sangue foi homogeneizado vertendo os tubos com anticoagulante e citrato de sódio, cuidadosamente, de 8 a 10 vezes. Parte do sangue coletado nos tubos com anticoagulante EDTA K₃ foi usado para a dosagem automatizada da concentração de hemoglobina por sistema automatizado (Horiba ABX®, Montpellier, França). A concentração de hemoglobina inferior a 12 g/dL foi adotada como critério de exclusão no estudo, uma vez que pode estar relacionada à presença de anemia (CHAUDHARY et al., 2017). Os tubos sem anticoagulante foram deixados em temperatura ambiente até formação do coágulo. Os tubos foram centrifugados a 1200 x g na centrífuga HimacCT6E (Hitachi, Tokyo, Japão), por 15 minutos, em temperatura ambiente, para obtenção do plasma e do soro. O plasma obtido a partir do tubo de EDTA K₃ foi aliquotado e utilizado para a avaliação de miRNA, LPS, LBP, sCD14, insulina, leptina, adiponectina e biomarcadores inflamatórios. O plasma obtido a partir do tubo contendo citrato foi utilizado para a avaliação da concentração de fibrinogênio e d-dímero. O soro obtido a partir do tubo sem anticoagulante foi utilizado para a avaliação do perfil lipídico, proteína C reativa (PCR), gama glutamil transferase (GGT); alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), amilase, ureia, creatinina e minerais (cálcio, magnésio, potássio e cloro).

5.4.1 Separação das Células Mononucleares

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*) são constituídas principalmente por linfócitos e monócitos, sendo facilmente coletadas por meio da colheita de sangue venoso. Essas células estão envolvidas nas respostas imune e inflamatória (SEN; KEMPPAINEN; OREŠIĆ, 2018). As PBMC circulam por todo o corpo e estão expostas aos tecidos metabólicos, como o fígado e o tecido adiposo e, portanto, podem refletir a saúde sistêmica e os efeitos das modificações dietéticas em nível de expressão gênica e conteúdo proteico (DE

MELLO; KOLEHMANIEN; SCHWAB; PULKKINEN *et al.*, 2012; TOMÉ-CARNEIRO; LARROSA; YÁNEZ-GASCÓN; DÁVALOS *et al.*, 2013). Diante desses fatos, optou-se por utilizar as PBMC para a análise de expressão gênica e o conteúdo e fosforilação de proteínas envolvidas na via de sinalização do NF-κB e MAPK.

Para obtenção de PBMC após retirada do plasma, o sangue remanescente nos tubos de EDTA K₃ foi reconstituído com o mesmo volume de solução salina estéril e tamponada com fosfato (PBS). Em um tubo de 50 mL ACCUSPIN™ System-Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), o sangue reconstituído foi adicionado, lentamente, com o auxílio de uma pipeta pasteur sobre a membrana do tubo. Em seguida, foi feita a centrifugação a 1000 x g, por 10 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, observou-se a separação das fases: plasma reconstituído, as PBMC acima da membrana e, abaixo dessa, o Histopaque®1077 junto com as células vermelhas. Com o auxílio de uma pipeta pasteur, a fase contendo as PBMC foi retirada e colocada lentamente em um tubo de 50 mL. Posteriormente, 10 mL de PBS foram adicionados para lavagem das células, centrifugando-se a 250 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e, por duas vezes, 5 mL de PBS foram adicionados para lavagem das células. Por fim, 3 mL de PBS foram utilizados para ressuspender o pellet. Vinte microlitros da suspensão de células foram adicionados em 380 µL (1:20) de solução de azul de trypan (0,4%), e homogeneizado. Em seguida, 10 µL dessa solução foi adicionado em câmara de Neubauer para contagem das células viáveis. Após a contagem, a suspensão de células foi distribuída da seguinte maneira: 4 x 10⁶ células para extração de miRNA; 1 x 10⁶ células para extração de mRNA e o restante para extração de proteínas. As amostras foram mantidas em -80 °C até análises futuras.

5.4.2 Análises bioquímicas

Glicemia de jejum capilar foi dosada em glicosímetro portátil (Accu-Chek® Active, Basel, Switzerland). A insulinemia foi determinada por meio de kit de imunoenensaio enzimático (ELISA) (Insulin Accubind Elisa Kit; Monobind Inc, Lake Forest, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O modelo matemático de avaliação da homeostase para resistência à insulina (*Homeostasis Model Assessment* -HOMA-IR) foi utilizado de acordo com a seguinte equação: HOMA –

$IR = (\text{glicose} \times \text{insulina}) \div 22,5$. Adotou-se o ponto de corte para a resistência à ação da insulina valores acima de 2,7, de acordo com GELONEZE et al. (2009).

A concentração plasmática de LPS foi analisada por meio de kit comercialmente disponível [Cambrex Limulus Amebocyte Lysate (LAL) kit; Lonza Inc, Walkersville, MD]. As concentrações plasmáticas de LBP e sCD14 foram analisadas pelos kits ELISA HK320-02 e HK315-02 (Hycult Biotech, Uden, Holanda), respectivamente. As concentrações plasmáticas de IL-6, IL-10, TNF- α , MCP1, sVCAM-1, sICAM-1, leptina e a adiponectina foram analisadas por meio de kits DuoSet® ELISA (R&D Systems, Minneapolis, EUA) Human IL-6 DY206, Human IL-10 DY217B, Human TNF- α DY210, Human CCL2/MCP-1 DY279, Human VCAM-1/CD106 DY809, Human ICAM-1/CD54 DY720, Human Leptin DY398 e Human Adiponectin/Acrp30 DY1065, respectivamente. Essas análises foram feitas por meio de ensaio colorimétrico em espectrofotômetro, conforme a orientação dos fabricantes.

As concentrações séricas de colesterol total, LDL, HDL, triacilglicerol, PCR, fibrinogênio, d-dímero, ALT, AST, GGT, amilase, ureia, creatinina e minerais foram avaliados por um sistema de dosagem automatizado (Roche, Cobas® 6000 analyzer, Basel, Switzerland) no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

O risco cardiovascular foi avaliado pela concentração de colesterol não-HDL e índice de Castelli 2. O colesterol não-HDL foi calculado usando o colesterol total subtraído pelo HDL (VERBEEK; HOVINGH; BOEKHOLDT, 2015), enquanto o índice de Castelli 2 foi calculado pela relação colesterol LDL/HDL, sendo que valores superiores a 2,9 são indicativos de risco cardiovascular (MILLÁN; PINTÓ; MUÑOZ; ZÚÑIGA *et al.*, 2009). A relação AST/ALT foi calculada e incluída como índice para avaliação de lesão hepática. Na doença hepática alcoólica, o índice AST/ALT, na maioria das vezes, é superior a 2, enquanto na esteatohepatite não-alcoólica este índice tende a ser inferior a 1 (HALL; CASH, 2012).

5.4.6 Análise da Expressão de mRNA em PBMC por RT-qPCR

1x10⁶ células foram lisadas em tampão RLT (Qiagen, Hilden, ME, Alemanha) suplementado com β-mercaptoetanol e transferido para homogeneização na coluna Qiashredder[®] (Qiagen, Hilden, ME, Alemanha). Em seguida, o homogeneizado foi purificado a partir do Min kit RNeasy (Qiagen, Hilden, ME, Alemanha), sendo transferido para coluna RNeasy[®] na qual o mRNA foi extraído e tratado com DNase (Qiagen, Hilden, ME, Alemanha) para remoção de DNA. Por fim, o mRNA extraído foi eluído em 30 a 50 µL de água livre de RNase. Um microlitro foi utilizado para a dosagem de mRNA em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, EUA), e o restante foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA). A síntese de cDNA foi feita a partir do mRNA extraído por transcrição reversa, utilizando o kit de Transcrição Reversa de cDNA de alta capacidade com inibidor de RNase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para realizar a transcrição reversa o Research PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research, St. Bruno, QC, Canada) foi programado conforme as especificações de tempo e temperatura indicadas no manual do produto. Concluída a reação, os microtubos contendo cDNA foram armazenados a - 40 °C para posterior utilização na técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

Dois microlitros de cDNA foram adicionados em 5 µL de TaqMan[®] Fast Advanced Master Mix (2x), 0,5 µL de TaqMan[®] Gene Expression Assay (FAM-MGB/20X), acrescido com água livre de RNase para um volume final de 10 µL por poço. Cada TaqMan[®] Gene Expression Assay contém um par de *primers* e uma sonda específicos para o gene de interesse. Foi analisada a expressão dos seguintes genes: *RELA* (Hs01042014_m1), *NFKB1* (Hs00765730_m1), *NFKBIA* (Hs00153283_m1); *TNF* (Hs00174128_m1), *IL1* (Hs01555410_m1), *IL6* (Hs00174131_m1), *IL10* (Hs00961622_m1), *TLR2* (Hs00152932_m1) e *TLR4* (Hs00152939_m1) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). O gene *RNA18S5* (Hs03928990_g1) foi utilizado como gene endógeno, pois foi o único a não apresentar variações entre os tempos de intervenção quando comparado a outros possíveis genes endógenos — GAPDH e beta-actina — testados em nosso laboratório. A amplificação foi realizada no MJ Research PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research, St. Bruno, QC, Canada) conforme as especificações de tempo e temperatura

indicadas no manual dos produtos. Os resultados serão analisados com base no valor de limiar de ciclo (C_t , *cicle threshold*). O cálculo de expressão relativa dos genes foi normalizado pela diferença entre ΔC_t das amostras (C_t do gene alvo - C_t do gene endógeno constitutivo) e a média obtida do ΔC_t no momento basal, resultando nos valores de $\Delta\Delta C_t$ de cada amostra. O cálculo da expressão de cada gene avaliado foi feito com base na equação descrita por (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008): Expressão relativa = $2^{(-\Delta\Delta C_t)} = 2^{-\Delta\Delta C_T} = [(C_T \text{ gene de interesse} - C_T \text{ controle endógeno}) \text{ amostra A} - (C_T \text{ gene de interesse} - C_T \text{ controle endógeno}) \text{ amostra B}]$.

5.4.8 Análise da expressão de miRNA no plasma e em PBMC

As análises de extração e expressão de miRNA foram realizadas em parceria com o laboratório Exiqon A/S Company, Vedbæk, Dinamarca.

a) Extração de miRNA do plasma e de PBMC

O RNA total foi extraído e purificado a partir de 200 μL de plasma utilizando o kit de isolamento de RNA miRCURY™ para fluidos biológicos (Qiagen, Hilden, ME, Alemanha) e a partir de 4×10^6 células utilizando o Mini Kit Qiagen miRNeasy® (Qiagen, Hilden, ME, Alemanha). O RNA total obtido em ambos os processos foi eluído em 50 μL de água livre de RNase adicionados no final da extração à membrana da coluna dos respectivos kits. Antes de iniciar a extração e purificação do RNA, em uma subamostra ($n=8$), foi adicionado um mix de RNA *spike-in* (UniSp2, UniSp4, UniSp5) ao tampão de lise, de acordo com o protocolo para RNA Spike-In Kit, For RT (Qiagen, Hilden, ME, Alemanha). As amostras contendo o RNA purificado foram armazenadas a - 80 °C até análises futuras.

b) Análise de miRNA por RT-qPCR

A identificação de miRNA por RT-qPCR foi feita a partir do sistema miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR (Qiagen, Hilden, ME, Alemanha), em que 5 ng/ μL de RNA extraídos a partir do plasma e das PBMC, foram transcritos de modo reverso

a partir do kit Universal II para síntese de cDNA. Para cada reação de transcrição reversa foi incluída uma amostra de RNA artificial (UniSp6), conforme o protocolo para RNA Spike-In Kit, For RT (Qiagen, Hilden, ME, Alemanha). O cDNA plasmático foi diluído 50x e o celular 100x e as reações de RT-qPCR foram realizadas de acordo com o protocolo para miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR. Cada microRNA foi analisado uma vez por RT-qPCR usando kit ExiLENT SYBR® Green master mix (Qiagen, Hilden, ME, Alemanha).

Inicialmente, para verificar o aumento ou a diminuição da expressão de miRNA após a intervenção com o suco de uva, foram analisados dois painéis de microRNA da empresa Exiqon®: um de miRNA plasmáticos com 179 miRNA (Anexo 7) e outro de miRNA oriundos de leucócitos com 137 miRNA (Anexo 8). Os miRNA de cada painel que apresentaram alteração significativa ($p < 0,05$) ($n = 8$) tiveram suas expressões analisadas no plasma e em PBMC nas demais participantes do estudo ($n = 12$) no momento basal e após 4 semanas de ingestão. Controles negativos foram realizados e identificados conforme as amostras. A amplificação foi realizada em LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Basel, BS, Suíça) em placas de 384 poços. Antes de iniciar o experimento, em uma subamostra ($n=12$), foi adicionado RNA artificial (UniSp3), de acordo com o protocolo para RNA Spike-In Kit, For RT (Qiagen, Hilden, ME, Alemanha). As curvas de amplificação foram analisadas utilizando o *software* LC Roche, tanto para a determinação de Cq (do inglês, *Cycle of quantification*) pelo método da segunda derivada e para a análise da curva de *melting*.

c) Controle de qualidade das amostras por análise de *RNA spike-in*

RNA *spike-in* são RNA transcritos não encontrados na amostra analisada utilizados para a calibração da (i) extração do RNA (UniSp2, UniSp4, UniSp5), (ii) controle da síntese de cDNA (UniSp6) e (iii) verificação do processo de amplificação por PCR interplacas (UniSp3). Sua utilização permite constatar a presença de inibidores da síntese de cDNA e na RT-qPCR, bem como a presença de nucleases (BLONDAL; NIELSEN; BAKER; ANDREASEN *et al.*, 2013). Para análise da expressão de RNA *spike-in* foi utilizado o RNA Spike-In Kit, For RT (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

d) Controle de qualidade das amostras por análise de hemólise

Uma importante fonte de variação nas amostras de plasma e soro é a potencial contaminação de miRNA derivado de células, especialmente decorrente de hemólise (BLONDAL; NIELSEN; BAKER; ANDREASEN *et al.*, 2013). Para verificação de hemólise nas amostras de plasma foram utilizados dois miRNA. Um que é expresso em eritrócitos (miRNA-451a) e outro que é relativamente estável no soro e no plasma e não é afetado pela hemólise (miR-23a-3p). A relação entre esses dois miRNA se correlaciona com o grau de hemólise. As amostras com proporções acima de 7,0 apresentam um risco maior de ocorrência de hemólise. Amostras com proporções menores geralmente não apresentam hemólise. Estes números referem-se a amostras humanas e podem variar entre espécies e doenças estudadas. Esta análise deve, portanto, ser interpretada com cautela (BLONDAL; NIELSEN; BAKER; ANDREASEN *et al.*, 2013).

e) Processamento e análise estatística dos dados de miRNA

As análises de dados obtidos por RT-qPCR foram realizadas para ensaios com valores de Cq entre 5 e 37 ciclos de amplificação. Os dados brutos foram normalizados por normalização global, incluindo ensaios detectados em todas as amostras. miRNA diferencialmente expressos entre controles (Basal) e grupos de quatro semanas (Tempo 2) foram determinados com o pacote R/Bioconductor LIMMA (RITCHIE *et al.*, 2015). O cálculo dos coeficientes parciais foi aplicado considerando os ensaios com menos de 6 leituras com falha por grupo. O nível de significância estatística foi definido como p-valor $\leq 0,05$ e variação absoluta da FC $\geq 1,25$.

f) Análise de redes gênicas

Após obtermos o padrão de expressão de miRNA, foram analisados os principais mRNA alvos, envolvidos na cascata de sinalização inflamatória. Foi utilizado o *software* Ingenuity Pathways Analysis v8.0-2602 IPA (Ingenuity® Systems) que nos permitiu examinar interações miRNA-mRNA preditos e/ou demonstrados experimentalmente (priorizando alvos baseados no contexto biológico

relevante para o processo inflamatório) e visualizar as interações moleculares entre estes miRNA e seus mRNA alvos e o impacto biológico relacionado. Para isso, foi feito um processo de filtragem que utiliza os bancos de dados de alvos de miRNA: *TarBase* (alvos que foram determinados experimentalmente) e o *TargetScan* (alvos preditos), onde podemos selecionar o nível de confiança (se foi testado experimentalmente ou não, e, se a predição possui alta ou baixa confiabilidade), o contexto biológico, o tipo de célula ou tecido, e a condição clínica. Redes inflamatórias foram construídas para permitir a visualização das interações moleculares entre os miRNA e seus mRNA alvos (experimentalmente validados, altamente preditos e moderadamente preditos).

5.4.7 Análise de Proteínas por *Western Blotting*

As PBMC foram lisadas em tampão RIPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), fluoreto de sódio (NaF) 1M, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 22,96 mM e ortovanadato (10 mM). O conteúdo proteico foi dosado a partir do kit para análise de proteínas Pierce™ BCA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), por ensaio colorimétrico em espectrofotômetro conforme orientação do fabricante.

Dez microgramas de proteínas totais de PBMC foram resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis - PAGE), TGX™ (Tris-Glycine eXtended) FastCast™ Acrylamide Solutions, 10%, (BioRad, Hercules, CA, EUA), utilizando equipamento tipo Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems com cuba Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (com capacidade para até quatro géis) (BioRad, Hercules, CA, EUA). Após eletroforese as proteínas separadas no gel foram transferidas eletricamente para membranas de nitrocelulose por 10 minutos no aparelho Power Blotter System® (Life Technologies, Shanghai, China). Em seguida as membranas foram coradas com solução vermelho ponceau (0,1% Ponceau S; 5% ácido acético) e digitalizadas para a verificação do processo de resolução das proteínas no gel durante a eletroforese.

A ligação inespecífica de anticorpos à membrana foi diminuída pela incubação dessas com solução bloqueadora de Albumina Bovina Sérica (BSA), 5% diluída em tampão TBST (Tris 10 mM, NaCl 1.5 mM e Tween 20 0,02%). Posteriormente, as

membranas foram incubadas por 4 horas em temperatura ambiente com anticorpos específicos da via de sinalização do NF- κ B [TAK1 (#5206), fosfo-TAK1 Thr184/187 (#4508), IKK β (#8943), fosfo-IKK α/β Ser176/180 (#2697), JNK (#3708), fosfo-SAPK/JNK Thr183/Tyr185 (#4668), I κ B α (#9242), fosfo-I κ B α Ser32 (#2859), NF- κ B e fosfo-NF- κ B p65 Ser536 (#3031)] e β -actina (#8457) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) para a normalização da quantificação das proteínas. Os anticorpos foram diluídos (1:1000) em TBST com 3% de BSA. Após incubação, as membranas foram lavadas com tampão TBST e incubadas com o anticorpo secundário adequado, conjugado com peroxidase (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) por 60 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas com solução contendo reagentes de quimioluminescência, Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad, Hercules, USA). As membranas foram reveladas e tiveram a intensidade de coloração determinada por densitometria no fotodocumentador ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, EUA). A intensidade das bandas foi normalizada pela β -actina para determinar a expressão relativa da proteína.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

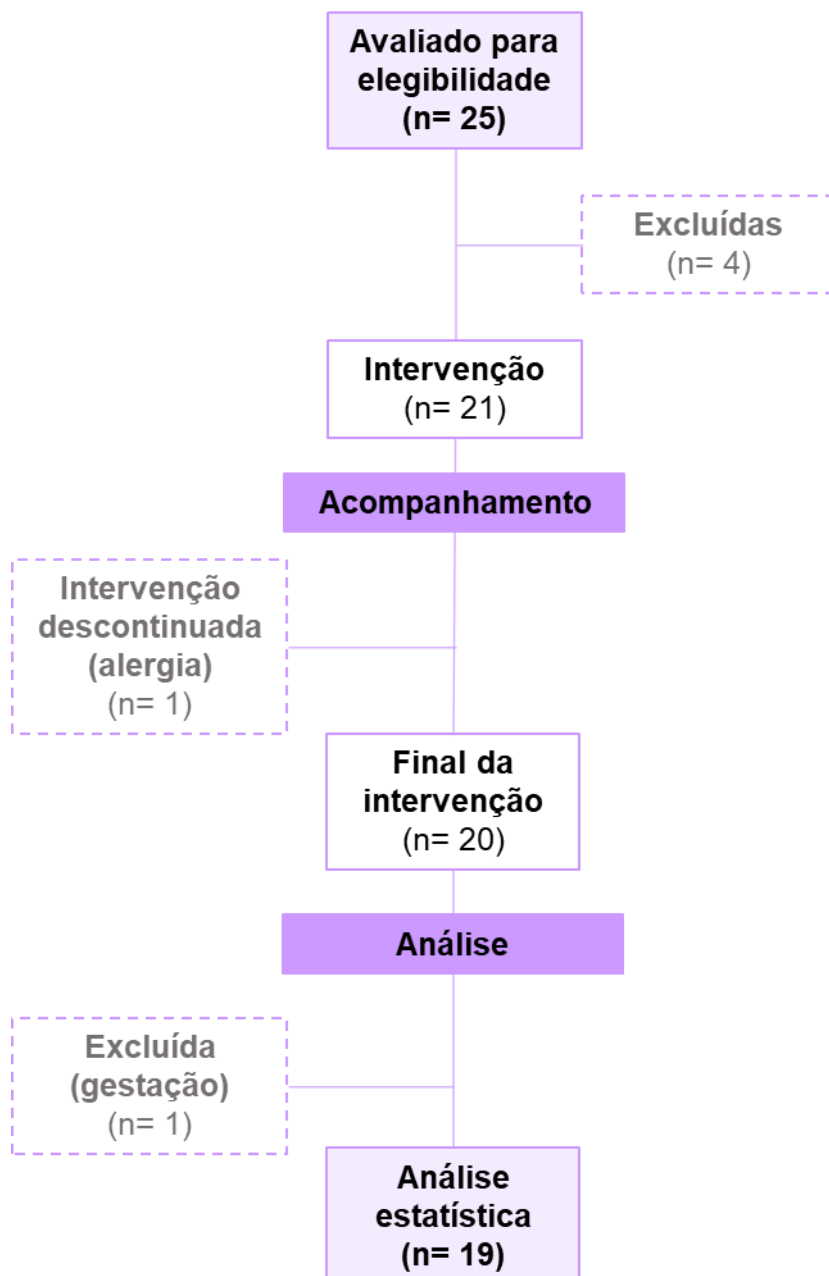
Os resultados foram apresentados em média e erro padrão ($X \pm EP$). Os Tempos 1 e 2 foram avaliados em relação ao momento basal por meio do *software* GraphPad Prism® 7. Todas as variáveis contínuas foram testadas para a adesão à distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal, a diferença entre as médias dos tempos foi avaliada pelo teste One-way ANOVA para amostras dependentes, com pós-teste para múltiplas comparações de Tukey e correção de Geisser-Greenhouse. Para as variáveis que não tiveram distribuição normal, a diferença entre as médias dos tempos foi avaliada pelo teste de Friedman, com pós-teste para múltiplas comparações de Dunn. Foi adotado um valor $p < 0,05$ para rejeição da hipótese de nulidade.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Entre as 25 voluntárias entrevistadas, quatro voluntárias desistiram do estudo, uma voluntária foi excluída por ter engravidado durante o estudo, e outra voluntária por relatar possível alergia ao suco de uva após três dias de ingestão. Desse modo, o estudo foi conduzido com um total de 19 voluntárias (**Figura 3**).

Figura 3 – Amostra.



As voluntárias tinham em média 27,1 anos e IMC médio de 27,1 kg/m², sendo, então, diagnosticadas com sobrepeso (OMS, 1995) (**Tabela 4**). A média da circunferência da cintura foi de 85,3 cm, cujo valor, segundo as Diretrizes Brasileiras de Obesidade (DE OBESIDADE, 2016), deve ser inferior a 80 cm. Diante desse resultado, constata-se que as voluntárias apresentavam aumento do risco cardiovascular e de diabetes tipo 2 (DE OBESIDADE, 2016) (**Tabela 4**). Todas as voluntárias eram normotensas, todavia apresentavam resistência à ação da insulina de acordo com a classificação do HOMA-IR (GELONEZE et al., 2009) (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Caracterização das voluntárias no momento basal.

	Média	DP
Idade (anos)	27,6	5,1
Peso (Kg)	69,9	1,2
IMC (Kg/m²)	27,1	0,3
Circunferência da cintura (cm)	85,3	1,3
Pressão arterial sistólica (mmHg)	110,9	1,8
Pressão arterial diastólica (mmHg)	70,9	1,4
Glicemia (mg/dL)	82,8	2,2
Insulina (µUI/mL)	18,2	1,6
HOMA-IR	3,6	0,3

6.2 ANÁLISE DO CONSUMO ALIMENTAR (RECORDATÓRIO DE 24 HORAS)

De acordo com os cálculos obtidos a partir dos três recordatórios alimentares de 24 horas obtidos de cada participante, o consumo médio energético e de carboidratos aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) após 4 e 2 semanas do protocolo experimental, respectivamente, em relação ao tempo basal (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Consumo alimentar médio a partir do recordatório de 24 horas.

	Basal		2 sem		4 sem		p-valor
	Média	EP	Média	EP	Média	EP	
Energia (Kcal)	1746	98,8	2007	129,5	2049*	87,4	0,030
Carboidratos (g)	200	15,5	257*	22,8	243	11,5	0,007
Fibras (g)	17	2,1	18	2,6	15	1,6	0,403
Proteínas (g)	58	5,0	66	6,4	69	5,6	0,264
Lipídios (g)	79	5,9	76	8,1	82	5,9	0,742
AG saturados (g)	24	2,9	21	3,1	24	2,5	0,779
AG poliinsaturados (g)	22	3,2	18	3,0	21	3,4	0,778
AG monoinsaturados (g)	23	2,1	23	2,8	22	1,8	0,935

EP, erro padrão; AG, ácidos graxos. * $p < 0,05$ versus basal. Análise estatística por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (n=16).

6.3 ANÁLISE DO PERFIL ANTROPOMÉTRICO E BIOQUÍMICO NOS TRÊS TEMPOS DE INTERVENÇÃO

Entre os exames bioquímicos analisados, verificou-se aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração de GGT após 4 semanas do protocolo experimental em relação ao tempo basal. Além disso, apesar das concentrações de triacilgliceróis e creatinina apresentarem diferença significativa ($p < 0,05$) no teste ANOVA, não se observou significância quando aplicado o pós-teste (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Resultados dos exames antropométricos e bioquímicos.

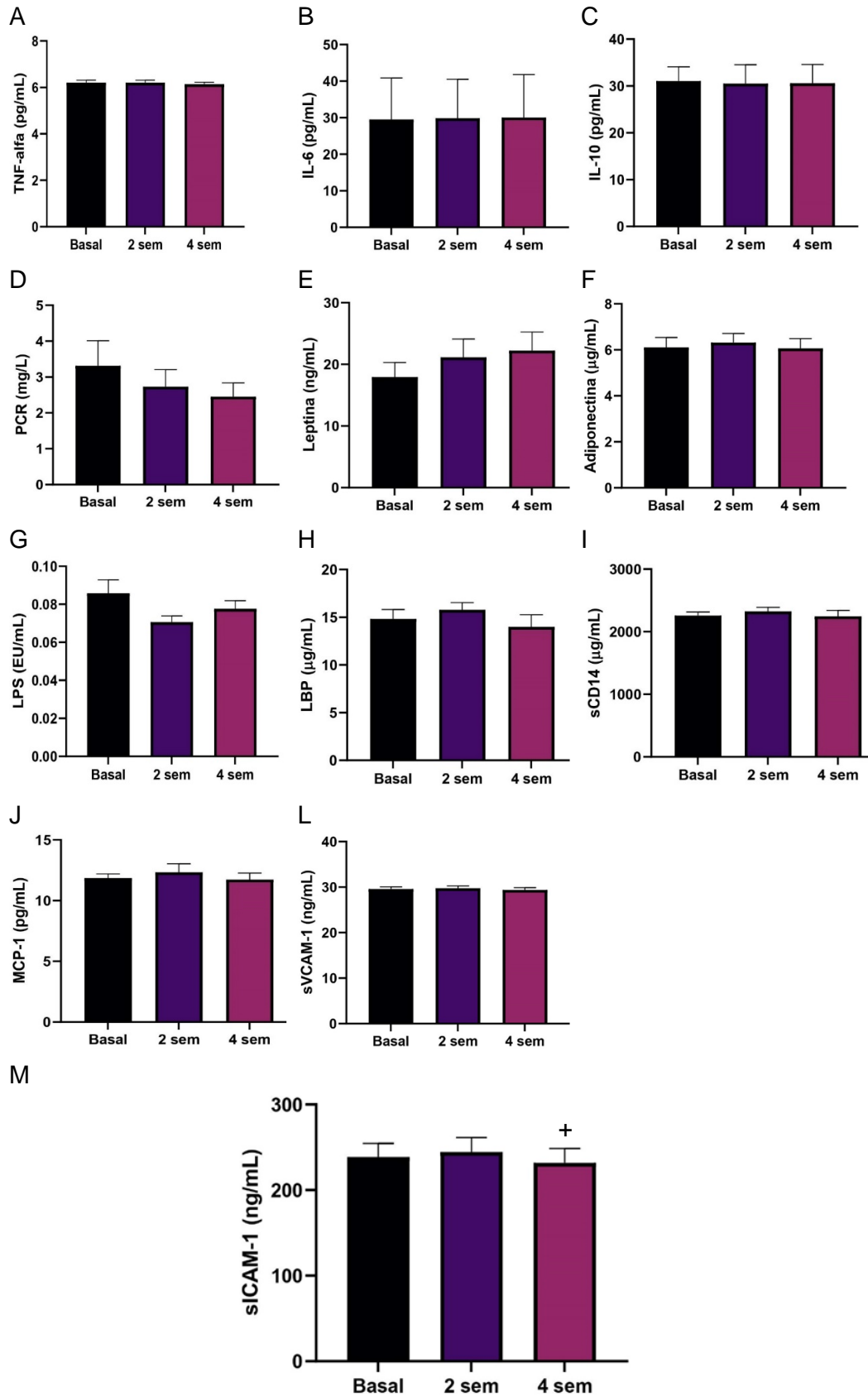
	Basal		2 sem		4 sem		p-valor
	Média	EP	Média	EP	Média	EP	
Peso (Kg)	69,9	1,2	70,0	1,2	70,3	1,2	0,287
IMC (Kg/m ²)	27,1	0,3	27,2	0,3	27,2	0,3	0,353
CC (cm)	85,3	1,3	85,3	1,0	85,9	1,2	0,636
CC/CQ	0,8	0,0	0,8	0,0	0,8	0,0	0,858
PAS (mmHg)	110,9	1,8	109,3	1,5	108,2	1,2	0,090
PAD (mmHg)	70,9	1,4	68,5	1,7	67,0	1,6	0,116
Glicemia (mg/dL)	82,8	2,2	79,2	2,0	77,4	2,2	0,212
Insulina (µUI/mL)	18,2	1,6	17,2	1,8	15,3	0,7	0,256
HOMA-IR	3,6	0,3	3,1	1,2	2,9	0,5	0,088
D-dímero (ng/mL)	542,5	43,8	574,9	58,5	490,4	41,2	0,156
Triacilgliceróis (mg/dL)	81,6	10,5	84,6	8,8	101,1	11,2	0,032
Colesterol total (mg/dL)	152,0	11,3	168,1	11,2	167,5	8,8	0,175
LDL-c (mg/dL)	86,9	9,3	97,6	9,0	93,3	7,0	0,223
HDL-c (mg/dL)	47,9	2,8	53,5	3,7	54,2	3,1	0,173
Colesterol não-HDL (mg/dL)	104,1	10,3	114,6	9,7	113,4	8,6	0,207
Índice de Castelli 2	1,9	0,2	1,9	0,2	1,8	0,2	0,543
ALT (U/L)	11,2	4,8	13,6	6,2	13,3	4,3	0,198
AST (U/L)	13,0	1,1	14,7	1,1	15,1	0,5	0,232
AST/ALT	1,5	0,2	1,5	0,1	1,5	0,1	0,840
GGT (U/L)	13,6	2,0	15,4	1,8	15,9*	1,7	0,014
Fibrinogênio (mg/dL)	303,8	16,8	290,4	14,3	303,9	13,3	0,591
Amilase (U/L)	47,7	4,5	50,1	3,2	54,8	3,5	0,074
Creatinina (mg/dL)	0,6	0,0	0,7	0,0	0,7	0,0	0,047
Uréia (mg/dL)	21,7	1,6	22,1	1,2	21,2	1,1	0,852
Cálcio (mg/dL)	7,1	0,4	7,59	0,4	8,1	0,3	0,143
Magnésio (mg/dL)	1,6	0,1	1,7	0,1	1,8	0,1	0,241
Sódio (mEq/L)	121,9	7,1	137,5	1,0	139,2	1,1	0,265
Potássio (mEq/L)	3,8	0,2	4,3	0,0	4,4	0,1	0,517
Cloro (mEq/L)	85,6	6,0	100,9	0,7	100,4	0,4	0,062

* p<0,05 versus basal. Análise estatística por one-way ANOVA com pós-teste de Tukey (n=16). EP, erro padrão.

6.4 ANÁLISE DOS BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS NOS TRÊS TEMPOS DA INTERVENÇÃO

Entre os biomarcadores inflamatórios plasmáticos, verificou-se que a concentração plasmática de ICAM-1 solúvel (sICAM-1), no tempo 4 semanas, foi significativamente inferior àquela observada no tempo 2 semanas (**Figura 4, M**).

Figura 4 – Concentração plasmática dos biomarcadores inflamatórios.

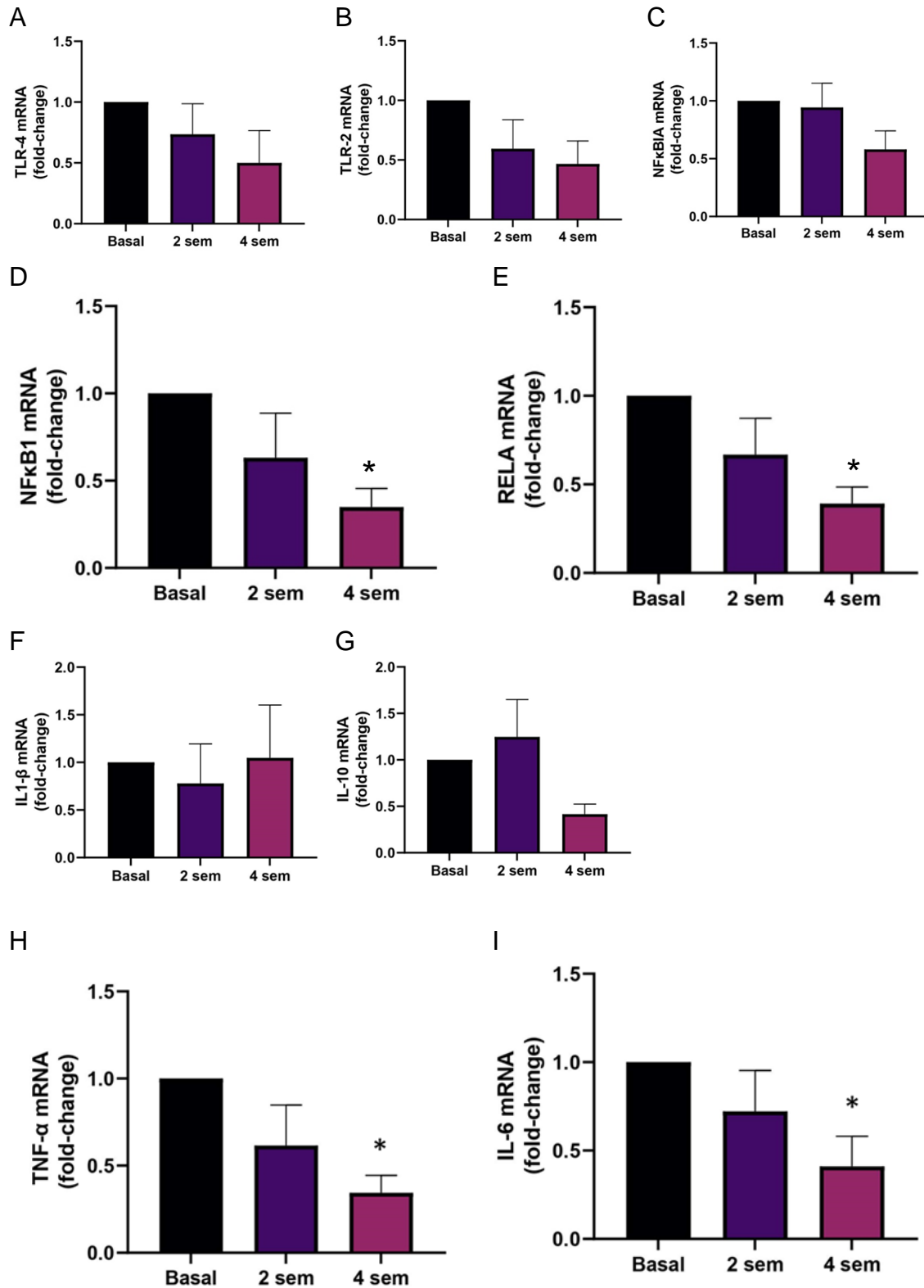


Valores apresentados em média e erro padrão. + p<0,05 momento 4 semanas versus 2 semanas. Análise estatística por *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (n=18).

6.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE mRNA EM PBMC NOS TRÊS TEMPOS DA INTERVENÇÃO

As expressões gênicas das subunidades do fator de transcrição NF-kB — p50 (NFkB1) e p65 (RELA) — em PBMC tiveram redução significativa ($p < 0,05$) após 4 semanas de ingestão do suco de uva em relação ao momento basal (**Figura 5, D e E**). Além disso, a ingestão do suco de uva, após 4 semanas, resultou em redução significativa da expressão gênica do TNF- α e da IL-6 em relação ao momento basal (**Figura 5, H e I**).

Figura 5 – Fold-change da expressão gênica de mRNA em PBMC.

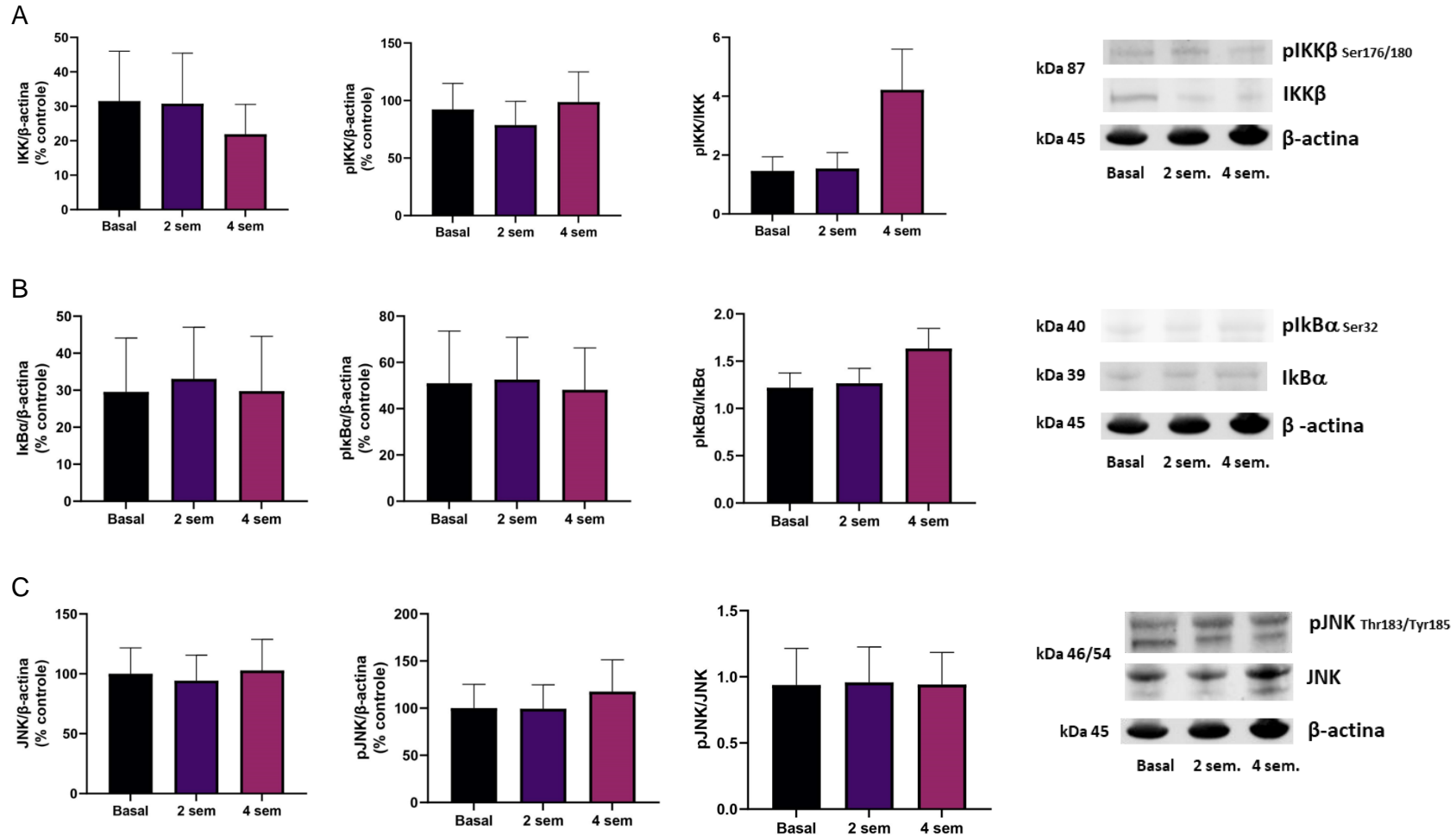


Valores apresentados em média e erro padrão. * $p < 0,05$ momento 4 semanas versus basal. Análise estatística por One-way ANOVA com pós-teste de Tukey (n=18).

6.6 ANÁLISE DO CONTEÚDO PROTEICO TOTAL E FOSFORILADO EM PBMC NOS TRÊS TEMPO DE INTERVENÇÃO

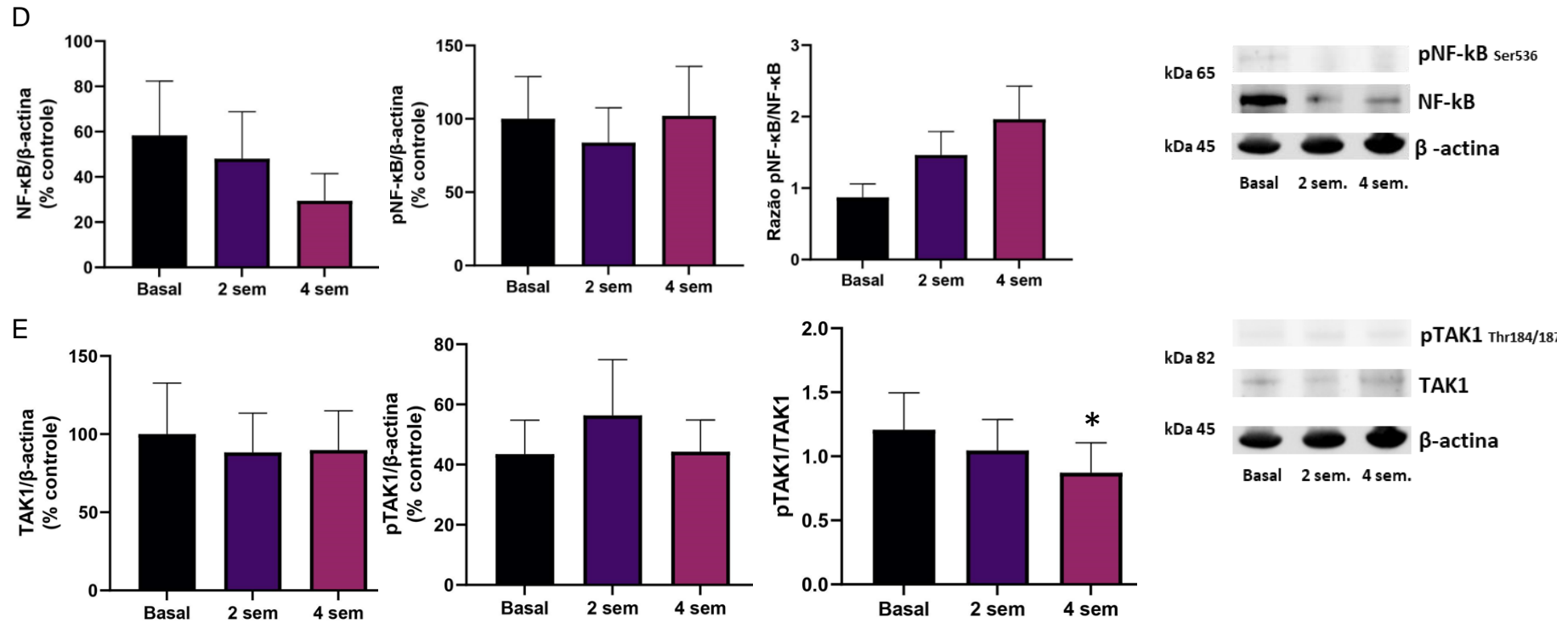
Entre as proteínas analisadas, em PBMC, que participam da via sinalização do NF- κ B, nenhuma sofreu alterações significativas no seu conteúdo total ou fosforilação após a intervenção com suco de uva. Entretanto, quando analisada a razão entre TAK1 fosforilada e TAK1 total, verificou-se redução significativa após 4 semanas de ingestão do suco de uva em relação ao momento basal (**Figura 6, E**).

Figura 6 – Conteúdo proteico total e fosforilado em PBMC.



Valores apresentados em média e erro padrão. Os tempos 2 e 4 semanas foram calculados de acordo com o percentual de variação em relação ao momento basal (% controle). * $p < 0,05$ momento 4 sem *versus* basal. Análise estatística por *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey ($n=18$).

Figura 6 – Conteúdo proteico total e fosforilado em PBMC (*continuação*).



Valores apresentados em média e erro padrão. Os tempos 2 e 4 semanas foram calculados de acordo com o percentual de variação em relação ao momento basal (% controle). * $p < 0,05$ momento 4 sem *versus* basal. Análise estatística por *One-way ANOVA* com pós-teste de Tukey ($n=18$).

6.7 ANÁLISE DOS microRNA NO PLASMA E EM PBMC NOS TRÊS TEMPOS DA INTERVENÇÃO

6.7.1 Plasma

No primeiro experimento, foi analisado um painel com 179 microRNA em 8 indivíduos (**Tabela 7**) a partir das amostras de plasma obtidas nos momentos basal e 4 semanas. Dentre eles, 5 microRNA apresentaram expressão significativamente diferente entre os tempos supracitados (**Tabela 8**).

Tabela 7 – Lista dos microRNA detectados no plasma dos ensaios realizados.

	Número de microRNA
Total de MicroRNA analisados	179
MicroRNA detectados em todas as amostras (n=8)	74
Média do número de microRNA detectados por amostra	149

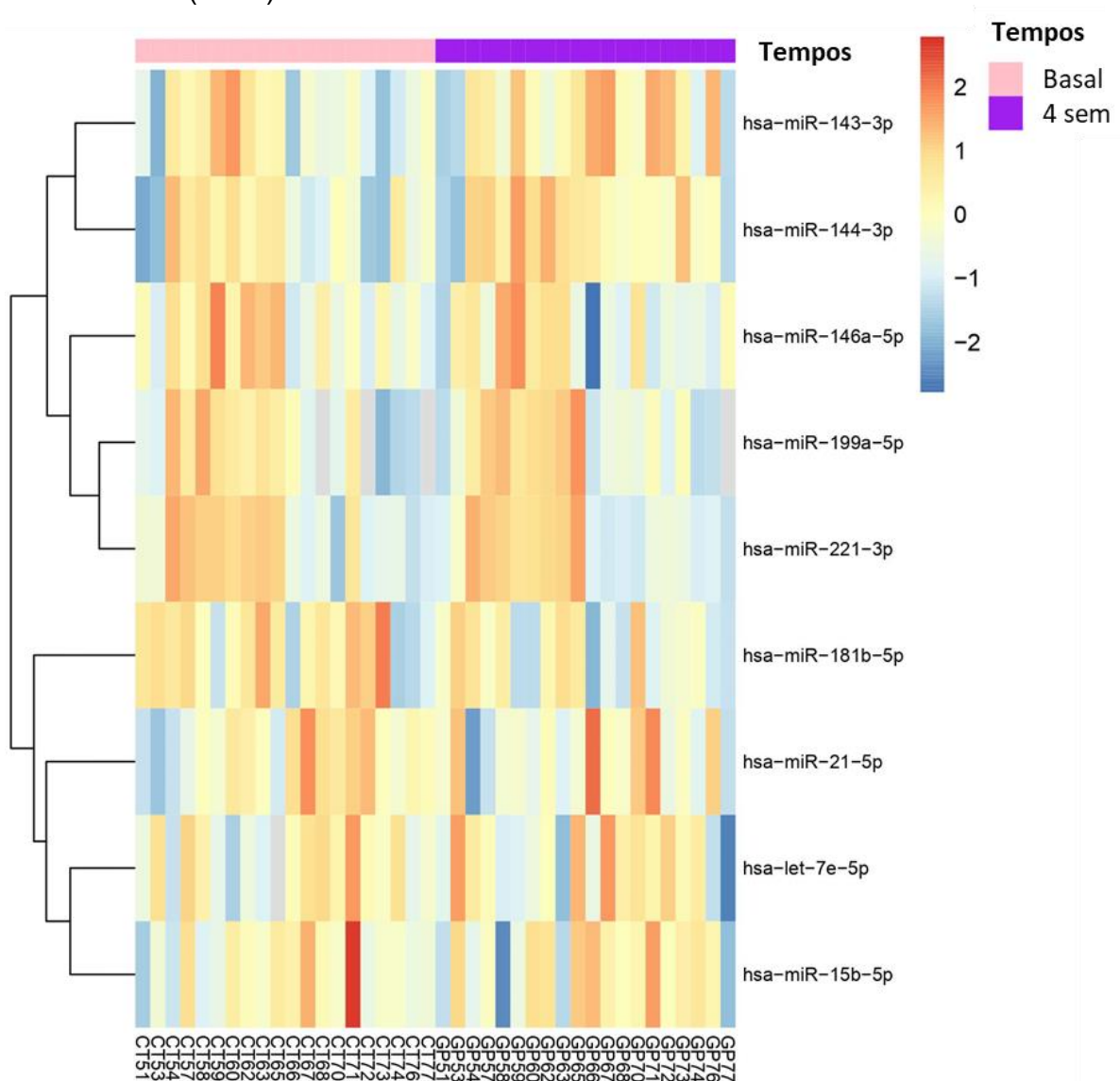
Tabela 8 – *Fold-change* (FC) dos miRNA plasmáticos que apresentaram diferença significativa entre os momentos basal e 4 semanas (n=8).

miRNA (hsa-)	Principais funções	Possíveis alvos	FC	p-valor
miR-144-5p	Ação anti-inflamatória	TLR-2	2,03	0,007
miR-30e-5p	Ação anti-inflamatória (CHEN; YIN; JIANG, 2021)	PTEN	1,54	0,010
miR-15b-5p	Ação anti-inflamatória (ZHAO; ZHAO; ZHANG; WANG <i>et al.</i> , 2017)	p50 e IKK- α	1,53	0,016
miR-148a-3p	Ação anti-inflamatória (PATEL; CARRION; HOLLANDS; HINTON <i>et al.</i> , 2015)	IKK- β	1,67	0,021
miR-424-5p	Ação anti-inflamatória (LI; ZHANG; DAI; XU, 2020)	APOC3	1,89	0,024

TLR-2, receptor do tipo toll-2; PTEN, Fosfatase homóloga à tensina, IKK- α , inibidor da subunidade alfa do fator nuclear kappa-B cinase IKK- β , inibidor da subunidade beta do fator nuclear kappa-B cinase; APOC3, apolipoproteína C3; Akt, proteína quinase B; JNK, c-Jun N-terminal quinase.

No restante das voluntárias, analisou-se a expressão dos microRNA plasmáticos significativos e outros relacionados ao processo inflamatório (**Figura 7**). Apesar de não se observar um padrão de expressão entre o momento basal e o tempo 4 semanas no heatmap supervisionado, verifica-se que a expressão do miR-144-5p aumentou (FC = 1,645) após 4 semanas da ingestão do suco de uva em relação ao momento basal ($p = 0,04$).

Figura 7 – Heatmap supervisionado dos microRNA no plasma nos momentos basal e 4 semanas (n=19).



Cada barra representa uma amostra. Tons avermelhados referem-se ao aumento da expressão do microRNA, enquanto tons azulados indicam redução da expressão (n=19).

6.7.1 PBMC

No primeiro experimento, foi analisado um painel com 137 microRNA em 8 indivíduos (**Tabela 9**), nos momentos basal e 4 semanas. Dentre eles, 3 microRNA apresentaram expressão significativamente diferente entre os tempos supracitados (**Tabela 10**).

Tabela 9 – Lista dos microRNA detectados em PBMC dos ensaios realizados.

	Número de microRNA
Total de MicroRNA analisados	137
MicroRNA detectados em todas as amostras (n=8)	72
Média do número de microRNA detectados por amostra	95

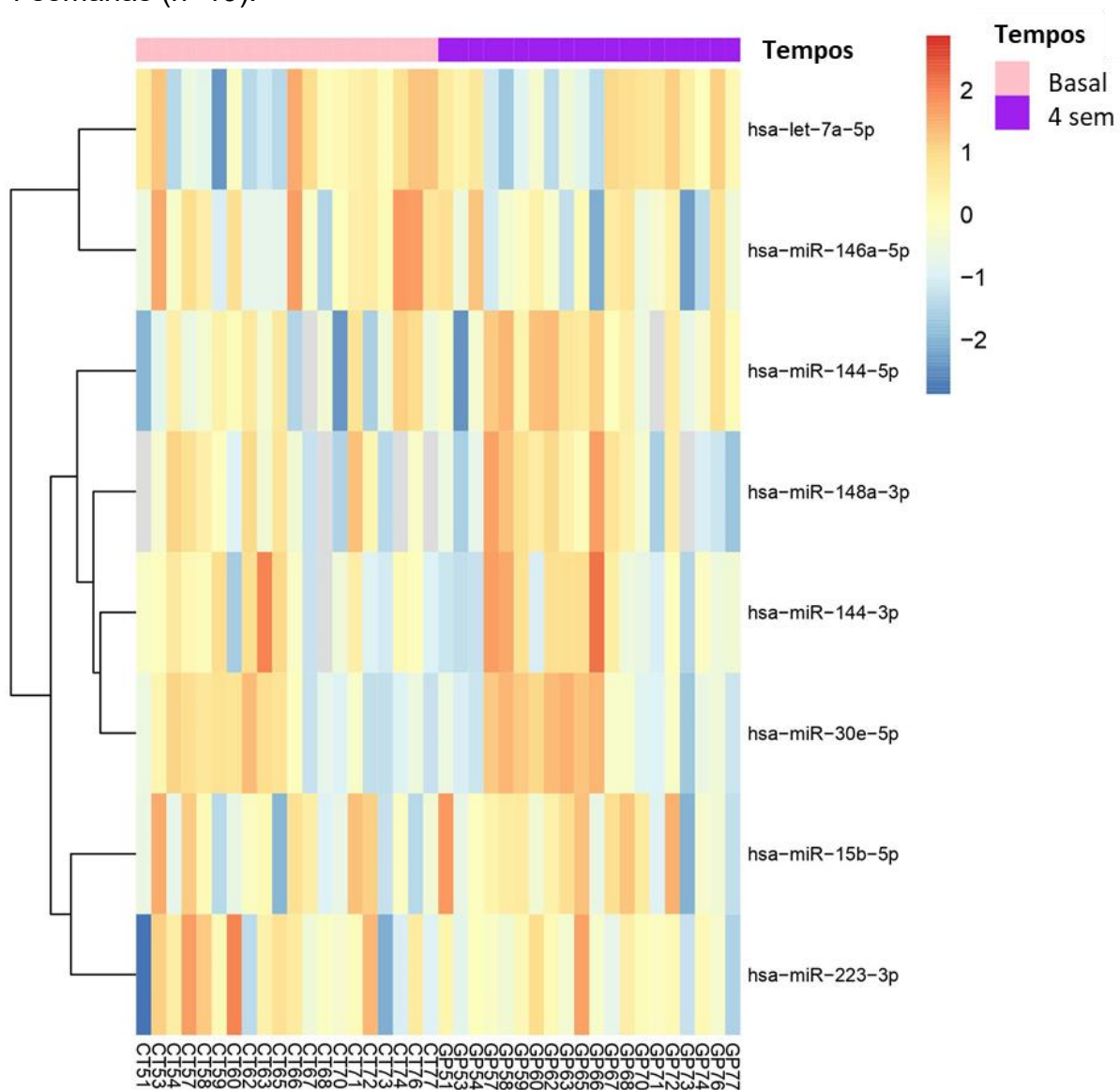
Tabela 10 – *Fold-change* (FC) dos miRNA de PBMC que apresentaram diferença significativa entre os momentos basal e 4 semanas (n=8).

miRNA (hsa-)	Principais funções	Possíveis alvos	FC	p-valor
miR-144-3p	Ação anti-inflamatória	Akt e JNK	1,81	0,005
	Ação anti-inflamatória (ZHAO; ZHAO; ZHANG; WANG <i>et al.</i> , 2017)	p50 e IKK- α		
miR-15b-5p			-1,60	0,027
	Ação anti-inflamatória (WANG; LI; SHI; WANG <i>et al.</i> , 2020)	MyD88		
miR-143-3p			-1,55	0,040

IKK- α , inibidor da subunidade alfa do fator nuclear kappa-B cinase; Akt, proteína quinase B; JNK, c-Jun N-terminal quinase; MyD88, fator de diferenciação mielóide 88.

No restante das voluntárias, em PBMC, analisou-se a expressão dos microRNA significativos expressos em PBMC, bem como outros microRNA relacionados ao processo inflamatório (**Figura 8**). Apesar de não se observar um padrão de expressão entre o momento basal e o tempo 4 semanas no heatmap supervisionado, verificou-se aumento da expressão do miR-144-3p (FC = 1,705), após 4 semanas de ingestão do suco de uva em relação ao momento basal (p = 0,02).

Figura 8 - Heatmap supervisionado dos microRNA em PBMC nos momentos basal e 4 semanas (n=19).



Cada barra representa uma amostra. Tons avermelhados referem-se ao aumento da expressão do microRNA, enquanto, tons azulados, redução (n=19).

7 DISCUSSÃO

A inclusão de 500 mL de suco de uva integral no hábito alimentar de mulheres com excesso de peso e resistência à ação da insulina reduziu a concentração plasmática de sICAM-1, bem como atenuou a expressão genes relacionados à resposta inflamatória — TNF- α , IL-6 e NF-kB — e modulou o miR-144-3p, em PBMC, e o miR-144-5p, no plasma. Junto a isso, a razão do conteúdo fosforilado e total da TAK-1, proteína importante na via de sinalização TLR4-NF-kB, apresentou redução em PBMC.

A alimentação constitui um fator de risco modificável relevante no contexto da redução do risco e tratamento de DCNT. A inclusão de frutas e hortaliças contribui para a ingestão de vitaminas e minerais, bem como compostos bioativos, os quais podem apresentar propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. A uva destaca-se por ser uma fruta com grande variedade de compostos bioativos, sendo muitos deles, associados a benefícios à saúde. Uma forma de consumo desta fruta é por meio de seu suco, que apresenta elevada produção, fácil acesso à população e maior densidade de compostos bioativos se comparado a fruta.

Uma das possíveis ações atribuídas aos nutrientes e compostos bioativos é a neutralização de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, constituindo uma forma direta de interação com estas moléculas. Entretanto, sabe-se que algumas destas substâncias podem modular a expressão de genes por meio de sua interação com o DNA ou por meio de mecanismos epigenéticos, como a alteração da expressão de microRNA (GONÇALVES; NUNES; FALCÃO; ALVES *et al.*, 2021; QUINTANILHA; REIS; DUARTE; COZZOLINO *et al.*, 2017).

No que concerne às pesquisas sobre a fisiopatologia envolvida nas DCNT, a modulação da expressão de genes envolvidos com a via inflamatória mediada pelo NF-kB tem sido alvo de estudos no campo da Nutrigenômica. Entre eles, estão os estudos cujo objetivo é analisar o efeito de nutrientes e de compostos bioativos de alimentos na expressão de inúmeros miRNA, os quais podem interferir na atividade dos fatores de transcrição NF-kB e AP-1 e, conseqüentemente, na modulação da resposta inflamatória (GHAFOURI-FARD; ABAK; FATTAHI; HUSSEN *et al.*, 2021). Além disso, por serem transportados na corrente sanguínea, os miRNA podem regular a expressão gênica de diversos tipos celulares, como as PBMC. Neste estudo, optou-

se pela análise de PBMC, uma vez que essas células são responsivas a intervenções nutricionais, representando um adequado modelo de avaliação de alterações metabólicas (REYNÉS; PRIEGO; CIFRE; OLIVER *et al.*, 2018). COSTA *et al.* (2021), em um estudo com indivíduos com obesidade submetidos a um programa de perda de peso, verificaram alteração da expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico em PBMC, após 6 meses de intervenção. Entre os genes estudados, destacam-se os genes *CPT1A*, *FASN* e *SREBP-1c*, os quais tiveram aumento da sua expressão e correlacionaram-se, positivamente, com peso corporal, razão da circunferência da cintura e quadril e percentual de gordura corporal.

Nesse contexto, no estudo em tela, verificou-se aumento significativo da expressão do miR-144-3p (FC= 1,70), em PBMC, e do miR-144-5p (FC= 1,65), no plasma, após 4 semanas de ingestão do suco de uva por mulheres com diagnóstico de sobrepeso e de resistência à ação da insulina.

A família do miR-144 abrange o miR-144-3p, miR-144-5p e miR-451, e destaca-se por suas ações no metabolismo lipídico e na regulação da glicemia. Entretanto, por possuírem diferentes sequências de bases nitrogenadas — apesar de complementares, no caso das fitas 5p e 3p —, esses miRNA podem apresentar alvos distintos, como, por exemplo, no contexto da via inflamatória mediada pelos fatores de transcrição NF-kB e AP-1, o miR-144-5p tem como alvo o TLR-2, enquanto, miR-144-3p, a Akt e JNK (LI; SHEN; TAO; ZHANG *et al.*, 2018).

O miR-144-5p, em um estudo com macrófagos humanos (THP-1) ativados por LPS, reduziu a expressão gênica e o conteúdo proteico do receptor do tipo Toll-2 (TLR-2) e do receptor de LDL oxidada (OLR)-1, acarretando menor síntese de citocinas pró-inflamatórias por estas células. O TLR-2 está presente em diversos tipos celulares e liga-se a epítomos de bactérias e moléculas de LDL oxidadas, as quais, também são detectadas pelo receptor OLR-1, presente em macrófagos e células endoteliais. A ativação destes receptores culmina na translocação do NF-kB para o núcleo e, conseqüentemente, aumento da transcrição de genes que codificam proteínas com ação pró-inflamatória (SHI; MA; LI; WANG *et al.*, 2020; ZHOU; LI; NI; JIANG *et al.*, 2020).

A ingestão de suco de uva não alterou a expressão gênica do TLR-2, em PBMC. Entretanto, sabe-se que os miRNA realizam a comunicação entre células, por isso, podem ser encontrados em fluidos corporais, como o plasma, onde ocorre o seu

transporte (WEBER et al., 2010). Assim, as PBMC, em resposta à intervenção nutricional, podem ter secretado no plasma o miR-144-5p (visto que apresentou aumento da expressão da sua fita complementar, miR-144-3p, no meio intracelular), para que seu efeito inibitório sobre este alvo possa ocorrer em outros tipos celulares que apresentam este receptor, mas não foram avaliados pelo nosso estudo, como as células endoteliais.

No estudo em tela, verificou-se menor concentração plasmática da molécula de adesão, sICAM-1, se comparado os tempos 2 e 4 semanas de ingestão do suco. A sICAM-1, assim como, a sVCAM-1, é uma proteína de membrana das células endoteliais, a qual favorece a migração de monócitos e de outros leucócitos, do sangue para o tecido, durante a resposta inflamatória. Por isso, correlaciona-se positivamente ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A menor expressão de moléculas de adesão após a ingestão de suco de uva já foi observada em outros estudos, os quais destacam a ação dos compostos fenólicos na atenuação da ativação do fator de transcrição NF-kB (JIANG et al.; PARK et al., 2009; ZHANG et al., 2016). LIU et al. (2017) mostraram que os miRNA têm papel relevante na regulação desta via por meio da modulação negativa da concentração plasmática da sICAM-1. Os autores verificaram que o resveratrol estimula a expressão do miR-221/222 em células endoteliais, cujo fato estaria envolvido na redução da síntese da subunidade p65 do NF-kB, o que resulta em menor expressão gênica da sICAM-1.

O miR-144-3p, o qual apresentou expressão elevada em PBMC após 4 semanas de intervenção, atua na via inflamatória por meio da modulação das proteínas intracelulares, Akt (homólogo celular do oncogene *akt8* do vírus do timoma murino) e JNK, as quais são alvos preditos pelo software online DIANA. A Akt participa da ativação do NF-kB por meio da fosforilação da subunidade alfa da IKK, a qual, por sua vez, fosforila o I κ B- α e a subunidade p65 deste fator de transcrição (BAI; UENO; VOGT, 2009). Além disso, a JNK promove a ativação do fator de transcrição AP-1, o qual também promove aumento da transcrição de mediadores pró-inflamatórios (SUGANAMI e OGAWA, 2010). Cabe destacar que, em nosso estudo, não avaliamos o conteúdo da proteína Akt, todavia o conteúdo proteico da JNK não alterou ao longo do protocolo experimental. Apesar de não ter sido observado alteração da concentração proteica do NF-kB, houve redução da expressão das suas subunidades

p50 e p65 após 4 semanas de intervenção, cujo fato pode estar relacionado a menor fosforilação da proteína intermediária desta via, a TAK-1, durante este momento.

A TAK-1, membro da família das MAPK, é responsável por mediar a ativação e translocação do citoplasma para o núcleo do NF- κ B e AP-1 a partir de sinais gerados por diferentes receptores como TLR-4, TNFR1 e IL-1R. Por ser o ponto central destas vias de sinalização, a TAK-1 tem sido alvo para o tratamento de doenças inflamatórias (TOTZKE; SCARNEO; YANG; HAYSTEAD, 2020; XU; LEI, 2020). Em se tratando de regulação por miRNA, o miR-143-3p tem como alvo a TAK-1. Neste estudo, na primeira análise de miRNA, realizada em uma amostra de 8 voluntárias, o miR-143-3p apresentou redução significativa da sua expressão após 4 semanas da ingestão de suco de uva. Entretanto, não houve diferença significativa quando avaliado o restante da amostra (TU; CHEN; CAI; DU *et al.*, 2020; WEN; HAN; CUI; WANG, 2020).

Ainda em relação a via do NF- κ B, após ativado, este é responsável por estimular a transcrição de genes pró-inflamatórios, por exemplo, das moléculas de adesão e citocinas, como o TNF- α e a IL-6, as quais, também, apresentaram a sua expressão atenuada após 4 semanas de intervenção. Em um estudo *in vitro*, com células dendríticas, verificou-se redução da expressão de TNF- α e IL-6 após tratamento com LPS e transfecção de mímicos do miR-144 (LI; SHEN; TAO; ZHANG *et al.*, 2018). Desta forma, o estudo em tela corrobora este resultado, uma vez que foi constatado aumento da expressão do miR-144 no plasma e em PBMC, bem como menor expressão das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-6 em PBMC.

Durante o processo inflamatório, as citocinas participam como moléculas sinalizadoras, contribuindo para a ativação de células do sistema imune. Neste contexto, diversos compostos bioativos presentes nos alimentos, como as antocianinas, podem atenuar a expressão de citocinas pró-inflamatórias (CREMONINI; DAVERI; MASTALLOUDIS; ADAMO *et al.*, 2019; KOZŁOWSKA; DZIERŻANOWSKI, 2021; OCKERMANN; HEADLEY; LIZIO; HANSMANN, 2021). Tal efeito foi verificado por KUNTZ *et al.* (2015), o qual, após tratamento de células intestinais ativadas por TNF- α e tratadas com um *pool* de antocianinas, e, também, apenas com a forma isolada da malvidina-3-glucosídeo (a segunda antocianina em maior concentração no suco utilizado em nosso estudo), verificaram redução da expressão gênica e da secreção de IL-6 e IL-8, e da expressão gênica da E-selectina, da ICAM-1, da VCAM-1 e do fator de transcrição NF- κ B.

As antocianinas fazem parte da classe dos flavanóis e são encontradas, predominantemente, associadas a glicosídeos, os quais mantêm a sua estabilidade e hidrofiliabilidade. A uva representa uma das principais fontes alimentares desses compostos bioativos e, no estudo em tela, o suco de uva apresentou maior concentração de delphinidina 3-glicosídeo, um dos 700 tipos de antocianinas descritos na literatura (KOZŁOWSKA; DZIERŻANOWSKI, 2021). Inúmeros estudos apontam efeitos benéficos da delphinidina e seus metabólitos na saúde como proteção cardiovascular e neurológica, melhora do metabolismo lipídico e resposta glicêmica, bem como ações antioxidantes e anti-inflamatórias (CHEN; ZHANG; SHI; LI *et al.*, 2019). No que concerne à via do fator de transcrição NF-κB, foco deste estudo, (CHO; KANG; SHIN; PARK *et al.*, 2015), em um estudo com fibroblastos humanos ativados com TGF-beta e tratados com 20μM de delphinidina, durante 24 horas, verificaram redução do conteúdo da subunidade p50 do NF-κB e da fosforilação da JNK induzida por este composto.

Como principais delimitações do estudo estão o tamanho da amostra, tempo de intervenção, e as variações interindividuais. O tempo atribuído para a ingestão do suco de uva foi baseado em estudos prévios da literatura, os quais observaram alterações nos parâmetros inflamatórios após 28 dias de consumo dessa bebida (GHANIM; SIA; UPADHYAY; KORZENIEWSKI *et al.*, 2010). Entretanto, o prolongamento deste período, associado a um maior número de participantes, poderia contribuir para obtenção de outros resultados com significância estatística.

Já a variação interindividual associada a fatores genéticos, composição da microbiota intestinal, hábitos de vida, como a alimentação, podem interferir na biodisponibilidade dos compostos bioativos do suco de uva. Além disso, quando se trata de antocianinas, sabe-se que sua biodisponibilidade é baixa, entretanto, sua metabolização por bactérias intestinais e pelo fígado acarreta síntese de compostos intermediários, os quais associam-se a efeitos benéficos à saúde (KAWABATA; YOSHIOKA; TERAO, 2019; LUCA; MACOVEI; BUJOR; MIRON *et al.*, 2020).

Em relação à alteração dos valores de gama glutamil transferase (GGT), o aumento associado ao consumo da bebida poderia ser explicado pela variação interindividual da resposta após o seu consumo. Entretanto, a concentração média desta enzima ainda permaneceu entre a faixa de referência para normalidade (8 a 41 U/L). O mesmo ocorreu com as concentrações de triacilglicerol e creatinina, as quais,

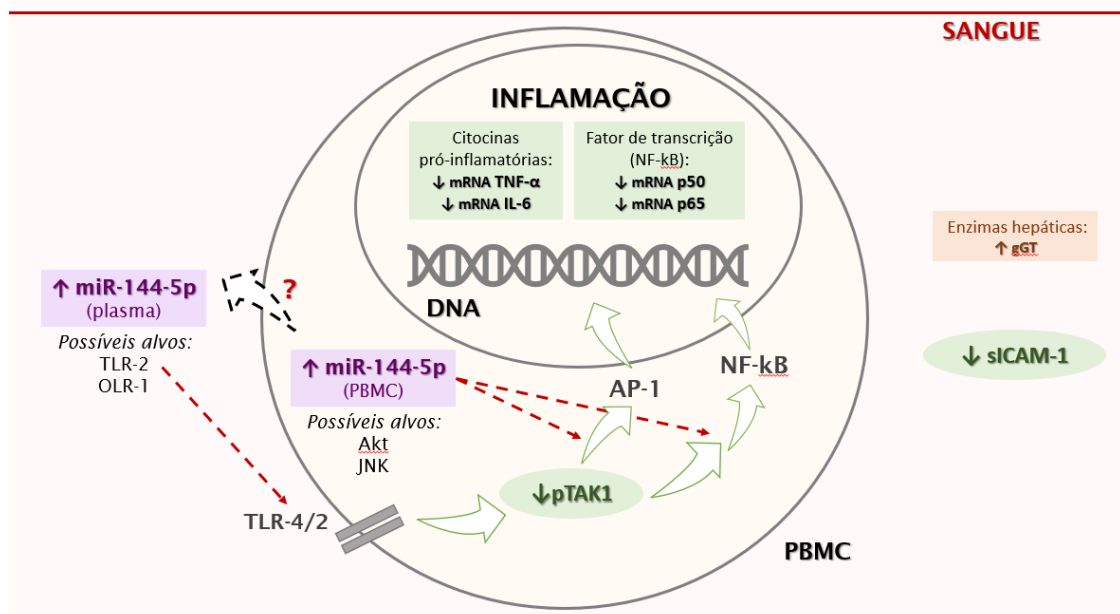
mesmo significativas segundo o teste ANOVA, não apresentaram diferença no pós-teste; e as médias das concentrações nos três tempos mantiveram-se dentro da faixa de referência para normalidade, inferior a 150 mg/dL e de 0,6 e 1,2 mg/dL, respectivamente.

8 CONCLUSÃO

Nosso estudo mostrou que a ingestão crônica de suco de uva atenuou, em PBMC, a expressão de genes pró-inflamatórios, bem como a ativação da TAK-1, importante proteína da via de sinalização do NF-κB. Estes resultados, provavelmente, ocorreram devido à ação de nutrientes e de compostos bioativos presentes no suco de uva em relação ao aumento da expressão do miR-144, o qual possui alvos envolvidos na regulação da resposta inflamatória (**Figura 9**).

Assim, no presente estudo, observou-se a ação de um alimento em mecanismos importantes relacionados à modulação da inflamação crônica, contribuindo para elaboração de estratégias de redução do risco de DCNT associadas ao excesso de peso. Ressalta-se, desta forma, que a presença de alimentos ricos em compostos bioativos pode contribuir para a saúde da população, contribuindo para a mitigação de DCNT.

Figura 9 – Efeitos da ingestão crônica de 500 mL de suco de uva integral por voluntárias com sobrepeso e resistência à ação da insulina.



9 REFERÊNCIAS

- AGHABOZORGI, A. S. et al. Circulating exosomal miRNAs in cardiovascular disease? Pathogenesis: New emerging hopes. **Journal of cellular physiology**, 2019. ISSN 0021-9541.
- AHMED, S. M. U. et al. Nrf2 signaling pathway: pivotal roles in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 2, p. 585-597, 2017. ISSN 0925-4439.
- ALIPOOR, B. et al. Association of miR-146a expression and type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. **International journal of molecular and cellular medicine**, v. 6, n. 3, p. 156, 2017.
- AMERES, S. L.; ZAMORE, P. D. Diversifying microRNA sequence and function. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 14, n. 8, p. 475-488, 2013. ISSN 1471-0072.
- ANGEL-MORALES, G.; NORATTO, G.; MERTENS-TALCOTT, S. Red wine polyphenolics reduce the expression of inflammation markers in human colon-derived CCD-18Co myofibroblast cells: potential role of microRNA-126. **Food & function**, v. 3, n. 7, p. 745-752, 2012.
- BAI, D.; UENO, L.; VOGT, P. K. Akt-mediated regulation of NFκB and the essentialness of NFκB for the oncogenicity of PI3K and Akt. **International journal of cancer**, 125, n. 12, p. 2863-2870, 2009.
- BASELGA-ESCUADERO, L. et al. Resveratrol and EGCG bind directly and distinctively to miR-33a and miR-122 and modulate divergently their levels in hepatic cells. **Nucleic acids research**, v. 42, n. 2, p. 882-892, 2013. ISSN 0305-1048.
- BALSEGA-ESCUADERO, L. et al. Long-term supplementation with a low dose of proanthocyanidins normalized liver miR-33a and miR-122 levels in high-fat diet-induced obese rats. **Nutrition research**, v. 35, n. 4, p. 337-345, 2015. ISSN 0271-5317.
- BASELGA-ESCUADERO, L. et al. Grape seed proanthocyanidins repress the hepatic lipid regulators miR-33 and miR-122 in rats. **Molecular nutrition & food research**, v. 56, n. 11, p. 1636-1646, 2012. ISSN 1613-4125.
- BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular immunology**, v. 40, n. 12, p. 845-859, 2004. ISSN 0161-5890.
- BEUTLER, B.; RIETSCHHEL, E. T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p. 169-176, 2003. ISSN 1474-1733.
- BIGAGLI, E. et al. Nutritionally relevant concentrations of resveratrol and hydroxytyrosol mitigate oxidative burst of human granulocytes and monocytes and the production of pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 43, p. 147-155, 2017. ISSN 1567-5769.
- BLADÉ, C. et al. miRNA s, polyphenols, and chronic disease. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n. 1, p. 58-70, 2013. ISSN 1613-4125.
- BLONDAL, T. et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. **Methods**, v. 59, n. 1, p. S1-S6, 2013. ISSN 1046-2023.

BOEING, H. et al. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. **European journal of nutrition**, v. 51, n. 6, p. 637-663, 2012. ISSN 1436-6207.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas e Agravos não Transmissíveis no Brasil 2021-2030 [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis. – **Brasília: Ministério da Saúde**, 2021.

BRASIL, V. vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2016. **Brasília: MS**, 2017.

CANI, P. D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1761-1772, 2007. ISSN 0012-1797.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642-655, 2009. ISSN 0092-8674.

CATALANOTTO, C.; COGONI, C.; ZARDO, G. MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 10, p. 1712, 2016.

CHAUDHARY, R.; DUBEY, A.; SONKER, A. Techniques used for the screening of hemoglobin levels in blood donors: current insights and future directions. **Journal of blood medicine**, v. 8, p. 75, 2017.

CHEN, Y.; YIN, Y.; JIANG, H. Mir-30e-5p Alleviates Inflammation and Cardiac Dysfunction After Myocardial Infarction Through Targeting Pten. **Inflammation**, 44, n. 2, p. 769-779, 2021.

CHEN, Y.; YIN, Y.; JIANG, H. Mir-30e-5p Alleviates Inflammation and Cardiac Dysfunction After Myocardial Infarction Through Targeting Pten. **Inflammation**, 44, n. 2, p. 769-779, 2021.

CHEN, Z.; ZHANG, R.; SHI, W.; LI, L. *et al.* The multifunctional benefits of naturally occurring delphinidin and its glycosides. **Journal of agricultural and food chemistry**, 67, n. 41, p. 11288-11306, 2019.

CHO, J.-S.; KANG, J.-H.; SHIN, J.-M.; PARK, I.-H. *et al.* Inhibitory effect of delphinidin on extracellular matrix production via the MAPK/NF- κ B pathway in nasal polyp-derived fibroblasts. **Allergy, asthma & immunology research**, 7, n. 3, p. 276-282, 2015.

COSME, F.; PINTO, T.; VILELA, A. Phenolic compounds and antioxidant activity in grape juices: A chemical and sensory view. **Beverages**, v. 4, n. 1, p. 22, 2018.

COSTA, A.; REYNÉS, B.; KONIECZNA, J.; MARTÍN, M. *et al.* Use of human PBMC to analyse the impact of obesity on lipid metabolism and metabolic status: a proof-of-concept pilot study. **Scientific reports**, 11, n. 1, p. 1-14, 2021.

CREMONINI, E.; DAVERI, E.; MASTALOUDIS, A.; ADAMO, A. M. *et al.* Anthocyanins protect the gastrointestinal tract from high fat diet-induced alterations in redox signaling, barrier integrity and dysbiosis. **Redox biology**, 26, p. 101269, 2019.

CURTI, V. et al. Modulation of human miR-17-3p expression by methyl 3-O-methyl gallate as explanation of its in vivo protective activities. **Molecular nutrition & food research**, v. 58, n. 9, p. 1776-1784, 2014. ISSN 1613-4125.

DE BUCK, M. et al. Structure and expression of different serum amyloid A (SAA) variants and their concentration-dependent functions during host insults. **Current medicinal chemistry**, v. 23, n. 17, p. 1725-1755, 2016. ISSN 0929-8673.

DE MELLO, V. D. F.; KOLEHMANIEN, M.; SCHWAB, U.; PULKKINEN, L. et al. Gene expression of peripheral blood mononuclear cells as a tool in dietary intervention studies: what do we know so far? **Molecular nutrition & food research**, 56, n. 7, p. 1160-1172, 2012.

DE OBESIDADE, D. B. **Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica.(2016)** 2016.

DE SILVA, N. et al. Effects of exosomes from LPS-activated macrophages on adipocyte gene expression, differentiation, and insulin-dependent glucose uptake. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 74, n. 4, p. 559-568, 2018. ISSN 1138-7548.

DENG, Z.-B. et al. Adipose tissue exosome-like vesicles mediate activation of macrophage-induced insulin resistance. **Diabetes**, v. 58, n. 11, p. 2498-2505, 2009. ISSN 0012-1797.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; VOGEL, S. N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 9, p. 903-914, 2002. ISSN 1286-4579.

EMILSSON, V. et al. Genetics of gene expression and its effect on disease. **Nature**, v. 452, n. 7186, p. 423, 2008. ISSN 1476-4687.

FALUDI, A. A. et al. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose-2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 2, p. 1-76, 2017. ISSN 0066-782X.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972. ISSN 0009-9147.

FRIEDMAN, R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome research**, v. 19, n. 1, p. 92-105, 2009. ISSN 1088-9051.

FUJIHARA, M. et al. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. **Pharmacology & therapeutics**, v. 100, n. 2, p. 171-194, 2003. ISSN 0163-7258.

FULEKI, T.; RICARDO-DA-SILVA, J. M. Effects of cultivar and processing method on the contents of catechins and procyanidins in grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 640-646, 2003. ISSN 0021-8561.

GALLAND, L. Diet and inflammation. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 25, n. 6, p. 634-640, 2010. ISSN 0884-5336.

GAO, Y. et al. Overexpression of miR-146a blocks the effect of LPS on RANKL-induced osteoclast differentiation. **Molecular medicine reports**, v. 18, n. 6, p. 5481-5488, 2018. ISSN 1791-2997.

GE, Q. et al. microRNAs as a new mechanism regulating adipose tissue inflammation in obesity and as a novel therapeutic strategy in the metabolic syndrome. **Journal of immunology research**, v. 2014, 2014. ISSN 2314-8861.

GELONEZE, B. et al. Índices HOMA1-IR e HOMA2-IR para a identificação de resistência à insulina e síndrome metabólica: Estudo Brasileiro de Síndrome Metabólica (BRAMS). **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 2, p. 281-7, 2009.

GHAFOURI-FARD, S.; ABAK, A.; FATTAHI, F.; HUSSEN, B. M. *et al.* The interaction between miRNAs/lncRNAs and nuclear factor- κ B (NF- κ B) in human disorders. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 138, p. 111519, 2021.

GHANIM, H. et al. Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and Toll-like receptor expression. **The American journal of clinical nutrition**, v. 91, n. 4, p. 940-949, 2010. ISSN 0002-9165.

GHAFOURI-FARD, S.; ABAK, A.; FATTAHI, F.; HUSSEN, B. M. *et al.* The interaction between miRNAs/lncRNAs and nuclear factor- κ B (NF- κ B) in human disorders. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 138, p. 111519, 2021.

GOMEZ, M.; LAJOLO, F.; CORDENUNSI, B. Evolution of Soluble Sugars During Ripening of Papaya Fruit and its Relation to Sweet Taste. *Journal of Food Science*, v. 67, n. 1, p. 442–447, jan. 2002.

GRACIA, A. et al. Are mirna-103, mirna-107 and mirna-122 involved in the prevention of liver steatosis induced by resveratrol? **Nutrients**, v. 9, n. 4, p. 360, 2017.

GRACIA, A. et al. Involvement of miR-539-5p in the inhibition of de novo lipogenesis induced by resveratrol in white adipose tissue. **Food & function**, v. 7, n. 3, p. 1680-1688, 2016.

GRAF, D. et al. Anthocyanin-rich juice lowers serum cholesterol, leptin, and resistin and improves plasma fatty acid composition in fischer rats. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66690, 2013. ISSN 1932-6203.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 415-445, 2011. ISSN 0732-0582.

GONÇALVES, A. C.; NUNES, A. R.; FALCÃO, A.; ALVES, G. *et al.* Dietary Effects of Anthocyanins in Human Health: A Comprehensive Review. **Pharmaceuticals**, 14, n. 7, p. 690, 2021.

GUO, L. et al. Integrative analysis of miRNA-mRNA and miRNA-miRNA interactions. **BioMed research international**, v. 2014, 2014. ISSN 2314-6133.

HAMMOND, S. M. An overview of microRNAs. **Advanced drug delivery reviews**, v. 87, p. 3-14, 2015. ISSN 0169-409X.

HALL, P.; CASH, J. What is the real function of the liver 'function' tests? **The Ulster medical journal**, 81, n. 1, p. 30, 2012.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. **Nutrition research**, v. 28, n. 3, p. 198-207, 2008. ISSN 0271-5317.

HIJMANS, J. G. et al. Influence of overweight and obesity on circulating inflammation-related microrna. **Microna**, v. 7, n. 2, p. 148-154, 2018. ISSN 2211-5366.

HOLLIS, J. H. et al. Effects of concord grape juice on appetite, diet, body weight, lipid profile, and antioxidant status of adults. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 28, n. 5, p. 574-582, 2009. ISSN 0731-5724.

HUANG, F.-T. et al. miR-143 targeting TAK1 attenuates pancreatic ductal adenocarcinoma progression via MAPK and NF- κ B pathway in vitro. **Digestive diseases and sciences**, v. 62, n. 4, p. 944-957, 2017. ISSN 0163-2116.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa Nacional de Saúde 2019. [acessado 2021 outubro 14]. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/saude/9160-pesquisa-nacional-de-saude.html?=&t=o-que-e>

IYER, A. et al. MicroRNA-146a: a key regulator of astrocyte-mediated inflammatory response. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e44789, 2012. ISSN 1932-6203.

JIANG, W.; LIU, G.; TANG, W. MicroRNA-182-5p Ameliorates Liver Ischemia-Reperfusion Injury by Suppressing Toll-Like Receptor 4. **8: Elsevier**, 2016. p.2809-2814.

JORDAN, S. D. et al. Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism. **Nature cell biology**, v. 13, n. 4, p. 434, 2011. ISSN 1476-4679.

JOVEN, J. et al. Plant-derived polyphenols regulate expression of miRNA paralogs miR-103/107 and miR-122 and prevent diet-induced fatty liver disease in hyperlipidemic mice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1820, n. 7, p. 894-899, 2012. ISSN 0304-4165.

JOVEN, J. et al. Polyphenols and the modulation of gene expression pathways: can we eat our way out of the danger of chronic disease? **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 54, n. 8, p. 985-1001, 2014. ISSN 1040-8398.

KAWABATA, K.; YOSHIOKA, Y.; TERAOKA, J. Role of intestinal microbiota in the bioavailability and physiological functions of dietary polyphenols. **Molecules**, 24, n. 2, p. 370, 2019.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. **Current opinion in immunology**, v. 17, n. 4, p. 338-344, 2005. ISSN 0952-7915.

KILIC, I. et al. **MicroRNA -143 and -223 in obesity**. Gene. 2: 140-2 p. 2015.

KIM, S. et al. Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. **Biochemical pharmacology**, v. 81, n. 11, p. 1343-1351, 2011. ISSN 0006-2952.

KIM, V. N.; NAM, J.-W. Genomics of microRNA. **TRENDS in Genetics**, v. 22, n. 3, p. 165-173, 2006. ISSN 0168-9525.

KONDKAR, A. A.; ABU-AMERO, K. K. Utility of circulating MicroRNAs as clinical biomarkers for cardiovascular diseases. **BioMed research international**, v. 2015, 2015. ISSN 2314-6133.

KOZŁOWSKA, A.; DZIERŻANOWSKI, T. Targeting Inflammation by Anthocyanins as the Novel Therapeutic Potential for Chronic Diseases: An Update. **Molecules**, 26, n. 14, p. 4380, 2021.

KUNTZ, S. et al. Inhibition of low-grade inflammation by anthocyanins from grape extract in an in vitro epithelial-endothelial co-culture model. **Food & function**, v. 6, n. 4, p. 1136-1149, 2015.

LANDMANN, R.; MÜLLER, B.; ZIMMERLI, W. CD14, new aspects of ligand and signal diversity. **Microbes and infection**, v. 2, n. 3, p. 295-304, 2000. ISSN 1286-4579.

LATRUFFE, N. et al. Exploring new ways of regulation by resveratrol involving miRNAs, with emphasis on inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1348, n. 1, p. 97-106, 2015. ISSN 1749-6632.

LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **The EMBO journal**, v. 23, n. 20, p. 4051-4060, 2004. ISSN 0261-4189.

LI, H. et al. Resveratrol repressed viability of U251 cells by miR-21 inhibiting of NF- κ B pathway. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 382, n. 1-2, p. 137-143, 2013. ISSN 0300-8177.

LIU, C.-W. et al. Resveratrol attenuates ICAM-1 expression and monocyte adhesiveness to TNF- α -treated endothelial cells: evidence for an anti-inflammatory cascade mediated by the miR-221/222/AMPK/p38/NF- κ B pathway. **Scientific reports**, v. 7, p. 44689, 2017. ISSN 2045-2322.

LI, C.; ZHANG, M.; DAI, Y.; XU, Z. MicroRNA-424-5p regulates aortic smooth muscle cell function in atherosclerosis by blocking APOC3-mediated nuclear factor- κ B signalling pathway. **Experimental physiology**, 105, n. 6, p. 1035-1049, 2020.

LI, R.-D.; SHEN, C.-H.; TAO, Y.-F.; ZHANG, X.-F. *et al.* MicroRNA-144 suppresses the expression of cytokines through targeting RANKL in the matured immune cells. **Cytokine**, 108, p. 197-204, 2018.

LONGO, M. et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 9, p. 2358, 2019.

LORENTE-CEBRIÁN, S. et al. MicroRNAs and other non-coding RNAs in adipose tissue and obesity: emerging roles as biomarkers and therapeutic targets. **Clinical Science**, v. 133, n. 1, p. 23-40, 2019. ISSN 0143-5221.

LUCA, S. V.; MACOVEI, I.; BUJOR, A.; MIRON, A. *et al.* Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. **Critical reviews in food science and nutrition**, 60, n. 4, p. 626-659, 2020.

MA, F. et al. Anti-inflammatory effects of curcumin are associated with down regulating microRNA-155 in LPS-treated macrophages and mice. **Pharmaceutical biology**, v. 55, n. 1, p. 1263-1273, 2017. ISSN 1388-0209.

MEHTA, R. et al. Circulating miRNA in patients with non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease. **BMJ open gastroenterology**, v. 3, n. 1, p. e000096, 2016. ISSN 2054-4774.

MEISTER, G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 7, p. 447-459, 2013. ISSN 1471-0056.

MILENKOVIC, D.; JUDE, B.; MORAND, C. miRNA as molecular target of polyphenols underlying their biological effects. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 64, p. 40-51, 2013. ISSN 0891-5849.

MILLÁN, J.; PINTÓ, X.; MUÑOZ, A.; ZÚÑIGA, M. *et al.* Lipoprotein ratios: physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. **Vascular health and risk management**, 5, p. 757, 2009.

MOHAMED, H. E. *et al.* Ameliorative effect of grape seed extract on metabolic disorders caused by high fat diet induced obesity in rats by reversing the increase in hepatic miR-33a and miR-122. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, n. 34, p. 699-708, 2016. ISSN 1996-0816.

MOKDAD, A. H. *et al.* Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. **Jama**, v. 289, n. 1, p. 76-79, 2003. ISSN 0098-7484.

MOREIRA, A. P. B. *et al.* Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 05, p. 801-809, 2012. ISSN 1475-2662.

MUKHOPADHYAY, P. *et al.* Modulation of microRNA 20b with resveratrol and longevinex is linked with their potent anti-angiogenic action in the ischaemic myocardium and synergistic effects of resveratrol and γ -tocotrienol. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 16, n. 10, p. 2504-2517, 2012. ISSN 1582-1838.

NATIVIDADE, M. M. P. *et al.* Simultaneous analysis of 25 phenolic compounds in grape juice for HPLC: Method validation and characterization of São Francisco Valley samples. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 665-674, 2013. ISSN 0026-265X.

NEVES, A. L. *et al.* Metabolic endotoxemia: a molecular link between obesity and cardiovascular risk. **Journal of molecular endocrinology**, v. 51, n. 2, p. R51-R64, 2013. ISSN 0952-5041.

OLIVEIRA, J. E.; MONTENEGRO JR, R. M.; VENCIO, S. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018 [Internet]. **São Paulo: Clannad**, 2017.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619-4626, 2001. ISSN 0021-8561.

PAN, M. H. *et al.* Antiobesity molecular mechanisms of action: Resveratrol and pterostilbene. **Biofactors**, v. 44, n. 1, p. 50-60, 2018. ISSN 0951-6433.

PARK, H.-K.; AHIMA, R. S. Leptin signaling. **F1000prime reports**, v. 6, 2014.

PARK, J. S. *et al.* Resveratrol inhibits tumor cell adhesion to endothelial cells by blocking ICAM-1 expression. **Anticancer Research**, v. 29, n. 1, p. 355-362, 2009. ISSN 0250-7005.

PATEL, V.; CARRION, K.; HOLLANDS, A.; HINTON, A. *et al.* The stretch responsive microRNA miR-148a-3p is a novel repressor of IKBKB, NF- κ B signaling, and inflammatory gene expression in human aortic valve cells. **The FASEB Journal**, 29, n. 5, p. 1859-1868, 2015.

PAUGH, S. W. *et al.* MicroRNAs form triplexes with double stranded DNA at sequence-specific binding sites; a eukaryotic mechanism via which microRNAs could directly alter gene expression. **PLoS computational biology**, v. 12, n. 2, p. e1004744, 2016. ISSN 1553-7358.

PRIOR, R. L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003. ISSN 0021-8561.

QUINTANILHA, B. et al. Nutrimiromics: role of microRNAs and nutrition in modulating inflammation and chronic diseases. **Nutrients**, v. 9, n. 11, p. 1168, 2017.

QUINTANILHA, B. J. Efeito de uma refeição hiperlipídica no período pós-prandial sobre a expressão de microRNA em mulheres saudáveis. 2018.

REYNÉS, B.; PRIEGO, T.; CIFRE, M.; OLIVER, P. *et al.* Peripheral blood cells, a transcriptomic tool in nutrigenomic and obesity studies: current state of the art. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, 17, n. 4, p. 1006-1020, 2018.

RIBEIRO, N. M.; NUNES, C. R. Análise de pigmentos de pimentões por cromatografia em papel. **Química nova na escola**, 29, n. 8, p. 34-37, 2008

ROCHA, V. Z.; LIBBY, P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. **Nature Reviews Cardiology**, v. 6, n. 6, p. 399, 2009. ISSN 1759-5010.

ROGERO, M.; CALDER, P. Obesity, inflammation, toll-like receptor 4 and fatty acids. **Nutrients**, v. 10, n. 4, p. 432, 2018.

SAFAEI, Mahmood et al. A systematic literature review on obesity: Understanding the causes & consequences of obesity and reviewing various machine learning approaches used to predict obesity. **Computers in biology and medicine**, p. 104754, 2021.

SAUTTER, C. K. et al. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 437-442, 2005. ISSN 0101-2061.

SELEM, S. S. C. et al. Validade e reprodutibilidade de um questionário de frequência alimentar para adultos de São Paulo, Brasil. **Rev Bras Epidemiol**, v. 17, n. 4, p. 852-9, 2014.

SEN, P.; KEMPPAINEN, E.; OREŠIČ, M. Perspectives on systems modeling of human peripheral blood mononuclear cells. **Frontiers in molecular biosciences**, 4, p. 96, 2018.

SHI, X.; MA, W.; LI, Y.; WANG, H. *et al.* MiR-144-5p limits experimental abdominal aortic aneurysm formation by mitigating M1 macrophage-associated inflammation: suppression of TLR2 and OLR1. **Journal of molecular and cellular cardiology**, 143, p. 1-14, 2020.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965. ISSN 0002-9254.

SONG, J. et al. Involvement of miR-Let7A in inflammatory response and cell survival/apoptosis regulated by resveratrol in THP-1 macrophage. **Nutrition Research and Practice**, v. 10, n. 4, p. 377-384, 2016. ISSN 1976-1457.

SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, n. 1, p. 33-39, 2010. ISSN 0741-5400.

SZKUDELSKA, K.; NOGOWSKI, L.; SZKUDELSKI, T. The inhibitory effect of resveratrol on leptin secretion from rat adipocytes. **European journal of clinical investigation**, v. 39, n. 10, p. 899-905, 2009. ISSN 0014-2972.

TAKANABE, R. et al. Up-regulated expression of microRNA-143 in association with obesity in adipose tissue of mice fed high-fat diet. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 376, n. 4, p. 728-732, 2008. ISSN 0006-291X.

TAY, Y. M. S. et al. MicroRNA-134 modulates the differentiation of mouse embryonic stem cells, where it causes post-transcriptional attenuation of Nanog and LRH1. **Stem cells**, v. 26, n. 1, p. 17-29, 2008. ISSN 1066-5099.

THOMOU, T. et al. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. **Nature**, v. 542, n. 7642, p. 450, 2017. ISSN 1476-4687.

TIJSEN, A. J.; PINTO, Y. M.; CREEMERS, E. E. Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for cardiovascular diseases. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 303, n. 9, p. H1085-H1095, 2012. ISSN 0363-6135.

TILI, E. et al. Resveratrol decreases the levels of miR-155 by upregulating miR-663, a microRNA targeting JunB and JunD. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 9, p. 1561-1566, 2010. ISSN 0143-3334.

TOMÉ-CARNEIRO, J. et al. One-year supplementation with a grape extract containing resveratrol modulates inflammatory-related microRNAs and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease. **Pharmacological research**, v. 72, p. 69-82, 2013. ISSN 1043-6618.

TRIANTAFILOU, M.; TRIANTAFILOU, K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. **Trends in immunology**, v. 23, n. 6, p. 301-304, 2002. ISSN 1471-4906.

UNAMUNO, X. et al. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. **European journal of clinical investigation**, v. 48, n. 9, p. e12997, 2018. ISSN 0014-2972.

VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature cell biology**, v. 9, n. 6, 2007. ISSN 1465-7392.

VAN BREDA, S. G. J.; DE KOK, T. M. C. M. Smart combinations of bioactive compounds in fruits and vegetables may guide new strategies for personalized prevention of chronic diseases. **Molecular nutrition & food research**, v. 62, n. 1, p. 1700597, 2018. ISSN 1613-4125.

VERBEEK, R.; HOVINGH, G. K.; BOEKHOLDT, S. M. Non-high-density lipoprotein cholesterol: current status as cardiovascular marker. **Current opinion in lipidology**, 26, n. 6, p. 502-510, 2015.

VEKIC, J. et al. Obesity and dyslipidemia. **Metabolism**, 2018. ISSN 0026-0495.

VIRANI, S. S. Non-HDL cholesterol as a metric of good quality of care: opportunities and challenges. **Texas Heart Institute Journal**, v. 38, n. 2, p. 160, 2011.

WAHID, F. et al. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 11, p. 1231-1243, 2010. ISSN 0167-4889.

WANG, Y. et al. Saturated palmitic acid induces myocardial inflammatory injuries through direct binding to TLR4 accessory protein MD2. **Nature Communications**, v. 8, 2017.

WANG, Y.; LI, H.; SHI, Y.; WANG, S. *et al.* miR-143-3p impacts on pulmonary inflammatory factors and cell apoptosis in mice with mycoplasmal pneumonia by regulating TLR4/MyD88/NF- κ B pathway. **Bioscience Reports**, 40, n. 7, p. BSR20193419, 2020.

WANG, Z. et al. Chronic constriction injury-induced microRNA-146a-5p alleviates neuropathic pain through suppression of IRAK1/TRAF6 signaling pathway. **Journal of neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 179, 2018. ISSN 1742-2094.

WEBER, J. A. et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. **Clinical chemistry**, v. 56, n. 11, p. 1733-1741, 2010. ISSN 0009-9147.

WESTHOLM, J. O.; LAI, E. C. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. **Biochimie**, v. 93, n. 11, p. 1897-1904, 2011. ISSN 0300-9084.

WONG, S. W. et al. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 40, p. 27384-27392, 2009. ISSN 0021-9258.

WORLD HEALTH, O. Physical status: The use of and interpretation of anthropometry, Report of a WHO Expert Committee. 1995.

WORLD HEALTH, O. **World health statistics 2010**. World Health Organization, 2010. ISBN 9241563982.

WORLD HEALTH, O. Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. 2013. ISSN 9241506237.

XIE, H.; LIM, B.; LODISH, H. F. MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity. **Diabetes**, v. 58, n. 5, p. 1050-1057, 2009. ISSN 0012-1797.

XIHUA, L. et al. Circulating miR-143-3p inhibition protects against insulin resistance in Metabolic Syndrome via targeting of the insulin-like growth factor 2 receptor. **Translational Research**, v. 205, p. 33-43, 2019. ISSN 1931-5244.

XU, Y.-R.; LEI, C.-Q. TAK1-TABs complex: a central signalosome in inflammatory responses. **Frontiers in Immunology**, 11, 2020.

YANG, J.-S.; LAI, E. C. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. **Molecular cell**, v. 43, n. 6, p. 892-903, 2011. ISSN 1097-2765.

YE, N. et al. Small molecule inhibitors targeting activator protein 1 (AP-1) miniperspective. **Journal of medicinal chemistry**, v. 57, n. 16, p. 6930-6948, 2014. ISSN 0022-2623.

YE, X. et al. Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation. **Nature structural & molecular biology**, v. 18, n. 6, p. 650-657, 2011. ISSN 1545-9993.

ZENZ, R. et al. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. **Arthritis research & therapy**, v. 10, n. 1, p. 201, 2008. ISSN 1478-6354.

ZHANG, J. et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 17-24, 2015. ISSN 1672-0229.

ZHANG, Z.; LI, Y.; LI, Y. Grape seed proanthocyanidin extracts prevent hyperglycemia-induced monocyte adhesion to aortic endothelial cells and ameliorates vascular inflammation in high-carbohydrate/high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 67, n. 5, p. 524-534, 2016. ISSN 0963-7486.

ZHAO, C.; ZHAO, Q.; ZHANG, C.; WANG, G. *et al.* miR-15b-5p resensitizes colon cancer cells to 5-fluorouracil by promoting apoptosis via the NF- κ B/XIAP axis. **Scientific reports**, 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

ZHOU, G.; LI, Y.; NI, J.; JIANG, P. *et al.* Role and mechanism of miR-144-5p in LPS-induced macrophages. **Experimental and therapeutic medicine**, 19, n. 1, p. 241-247, 2020.

ZHU, L. et al. FFAs and adipokine-mediated regulation of hsa-miR-143 expression in human adipocytes. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 10, p. 5669-5675, 2013. ISSN 0301-4851.

ZHU, N. et al. Endothelial enriched microRNAs regulate angiotensin II-induced endothelial inflammation and migration. **Atherosclerosis**, v. 215, n. 2, p. 286-293, 2011. ISSN 0021-9150.






Cartaz de divulgação para recrutamento de voluntárias

RECRUTAM-SE VOLUNTÁRIAS



para pesquisa científica sobre
**Inflamação e ingestão de Sucos
de Uva e de Laranja**

Requisitos:

-  **Sexo feminino (18 a 40 anos)**
-  **Não fumante**
-  **Não ser vegetariana**
-  **Não ter nenhum problema de saúde**
-  **Índice de Massa Corporal (25,0 a 29,9 kg/m² - Sobrepeso)**

- ✓ **SUCOS FORNECIDOS GRATUITAMENTE;**
- ✓ **ENTREGA DE SUCOS EM DOMICÍLIO;**
- ✓ **RESULTADO DOS EXAMES LABORATORIAIS.**

Interessadas falar com BRUNA
 (11) 95559-9891



Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero - Comitê de Ética (CAAE
69382117.6.0000.5421/69382217.9.0000.5421)

ANEXO 2

Modelo do questionário para a caracterização e a confirmação da adequação nos critérios de inclusão das interessadas



CADASTRO			
Nome completo:			
E-mail:			
Telefones:			
Endereço:	Bairro:	Cidade:	CEP:
Ocupação/Período:			
Horários em casa:			
Conhecimento do estudo:			
DADOS			
Data de nascimento:	<input type="text"/>	Idade:	<input type="text"/>
Vegetariano?	<input type="text"/> Sim	<input type="text"/> Não	<input type="text"/>
Atleta?	<input type="text"/> Sim	<input type="text"/> Não	<input type="text"/>
Pratica exercício físico?*	<input type="text"/> Sim	<input type="text"/> Não	<input type="text"/>
Quai(s)?	<input type="text"/>		
Frequência?	<input type="text"/>		
<i>*Não pode ter praticado exercício físico 48 horas antes da realização do estudo!</i>			
Fuma?	<input type="text"/> Sim	<input type="text"/> Não	<input type="text"/>
Ex-fumante? (mín. 5 anos)	<input type="text"/> Sim	<input type="text"/> Não	<input type="text"/>
Ingere bebida alcoólica?	<input type="text"/> Sim	<input type="text"/> Não	<input type="text"/>
	Quanto?		
	Frequência?		
Ingere com frequência suco natural de uva?	<input type="text"/> Sim	<input type="text"/> Não	<input type="text"/>
	Quanto?		
	Frequência?		
Ingere com frequência suco natural de laranja?	<input type="text"/> Sim	<input type="text"/> Não	<input type="text"/>
	Quanto?		
	Frequência?		

Problemas de saúde:		Recentemente, teve algum problema de saúde?			
HAS	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Qual?	
Diabetes mellitus	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>	Há quanto tempo?	
Colesterol alto	<input type="checkbox"/>				
LDL elevado	<input type="checkbox"/>	Fez alguma cirurgia há pouco tempo?			
TG elevado	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Qual?	
Gastrite	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>	Há quanto tempo?	
Problema Gastrointestinal Crônico	<input type="checkbox"/>				
Outros (Quais?)	<input type="text"/>				
Medicação/Suplemento?	Sim <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Quais?		
	Não <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
Fazer uso de medicação prescrita para controlar inflamação?	Sim <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Quais?		
	Não <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
Gravidez?	Sim <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Anticoncepcional?	Sim <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Data da última menstruação:
					<input type="text"/>
DADOS ANTROPOMÉTRICOS					
Peso (Kg)	<input type="text"/>				
Estatura (m)	<input type="text"/>	Classificação			
IMC (kg/m ²)	<input type="text"/>	<i>Inclusa = entre 25 a 29,9 kg/m²</i>			
Circunferência da cintura (cm)	<input type="text"/>				
Circunferência do quadril (cm)	<input type="text"/>				
Pressão Arterial (mmHg)	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Média	
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
Classificação:					
CUMPRE CRITÉRIOS DE INCLUSÃO					
	Sim <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
	Não <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Motivo(s):		
DATA DA INTERVENÇÃO					
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
SUCO					
DATAS E ENTREGA					
1ª Coleta de Sangue:	1 Entrega: <input type="text"/>		Horário:		
2ª Coleta de Sangue:	2 Entrega: <input type="text"/>		Horário:		
3ª Coleta de Sangue:	<input type="text"/>				
Endereço Entregas:	Bairro:				
Cidade:	CEP:	Responsável:		Tel.:	

Universidade de São Paulo - Faculdade de Saúde Pública
 Av. Dr. Arnaldo, 715 / Cerqueira César / Tel: (11) 3061-7850

ANEXO 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO: Efeito crônico do suco de uva integral sobre o perfil de microRNA e resposta inflamatória em mulheres com sobrepeso.

INTRODUÇÃO

Estudos científicos sugerem que o excesso de gordura corporal pode ocasionar um estado crônico inflamatório, podendo alterar o perfil lipídico e a concentração sanguínea de alguns marcadores inflamatórios. Sabe-se hoje, que a inflamação é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do diabetes e das doenças cardiovasculares. A proposta deste estudo é avaliar se o suco de uva integral tem a capacidade de atenuar a resposta inflamatória gerada pelo excesso de gordura corporal.

COMO É O ESTUDO?

O participante do estudo consumirá, no período de 4 semanas, 500 mL por dia de suco de uva integral. A quantidade total de garrafas do suco a serem consumidas durante todo o período de intervenção será fornecida aos participantes pelos pesquisadores após a assinatura deste termo. A entrega em domicílio será totalmente custeada pela pesquisa. Durante o estudo, haverá três coletas de sangue sendo a primeira antes da intervenção e as demais após 2 e 4 semanas do consumo do suco de uva integral. O volume de sangue coletado em cada momento será de 30 mL, o qual será utilizado para avaliar a concentração de glicose, insulina, perfil lipídico, leptina, adiponectina, lipopolissacarídeos (LPS) e seus ligantes LBP e sCD14, e biomarcadores inflamatórios, bem como avaliar, de microRNA e proteínas envolvidos na inflamação.

OUTRAS INFORMAÇÕES

O participante não terá nenhum custo por participar da pesquisa.

O único risco durante a participação deste estudo é a dor da picada da agulha para coleta do sangue. Esta picada será realizada uma única vez em cada momento. Caso o senhor tenha algum problema em decorrência da coleta do sangue, os enfermeiros e técnicos do Centro de Saúde Escola Geraldo de Paula de Souza estarão à disposição para ajudá-lo no que for preciso. Sua participação é totalmente voluntária, podendo desistir e retirar seu consentimento a qualquer momento durante o decorrer da pesquisa.

Seus dados são secretos e sigilosos de acordo com as normas brasileiras. Os resultados desta pesquisa poderão ser publicados em revistas científicas, mas a sua identidade será preservada.

A qualquer momento o participante poderá esclarecer dúvidas por meio dos seguintes contatos:

- ✓ Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero – Investigador Principal: fone (11-3061-7850);
- ✓ Bruna Jardim Quintanilha - aluna de doutorado da Faculdade de Saúde Pública da USP: fone (11-3061-7850);
- ✓ Você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da

Faculdade de Saúde Pública da USP (11-3061-7779) que fica na Av. Dr. Arnaldo, 715 - São Paulo - SP - Brasil - CEP - 01246-904. O horário de funcionamento do Comitê de Ética da Faculdade de Saúde Pública da USP é das 8 h às 12 h.

O Comitê de Ética em Pesquisa é um comitê interdisciplinar, constituído por profissionais de ambos os sexos, além de pelo menos um representante da comunidade. Este comitê tem como objetivo proteger o bem-estar de indivíduos que participam de pesquisas científicas, bem como orientar e regulamentar pesquisas e atividades práticas que envolvam intervenções com seres humanos, de modo a garantir e resguardar a integridade e os direitos dos sujeitos da pesquisa.

COMO PARTICIPAR?

A participação neste estudo é inteiramente voluntária. Para isso o participante deve assinar esse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, bem como o responsável por este estudo. As assinaturas devem ser realizadas em duas cópias. Uma fica com o participante e a outra fica com o responsável pela pesquisa.

Declaro que li o termo de consentimento livre e esclarecido para esse estudo e aceito participar voluntariamente desse estudo. Ainda, declaro que recebi todos os esclarecimentos necessários para compreender o estudo e tive tempo suficiente para decidir minha participação no estudo.

Nome Completo do Participante:

Assinatura do Participante:

Data: ____/____/____

Investigador:

Assinatura do Investigador:

Data: ____/____/____

ANEXO 4

Modelo de calendário entregue às voluntárias

agosto

Mês do Calendário

2017

Ano do Calendário

Domingo

Primeiro dia da semana



	domingo	segunda-feira	terça-feira	quarta-feira	quinta-feira	sexta-feira	sábado
30		31	01	02	03	04	05
06		07	08	09	10	11	12
13		14	15	16	17	18	19
			Não ingerir bebidas alcóolicas.	Não ingerir bebidas alcóolicas.	Não ingerir bebidas alcóolicas.	Não ingerir bebidas alcóolicas.	Não ingerir bebidas alcóolicas.
20		21	22	23	24	25	26
Não praticar exercícios físicos		Jejum 12 h Não ingerir bebidas alcóolicas.	 Coleta de Sangue + entrega de fezes + QFA + Antropometria (Entrega de 2 L suco)	 Entrega motoboy de quant. correspondente a 14 dias de suco (7 L).	Não ingerir bebidas alcóolicas.	Não ingerir bebidas alcóolicas.	Não ingerir bebidas alcóolicas.
27		28	29	30	31	01	02
			Não ingerir bebidas alcóolicas.	Não ingerir bebidas alcóolicas.	Não ingerir bebidas alcóolicas.	01	02
03		04	05	06	07	08	09
<p>Anotações</p> <p># Beba 500 mL suco/dia;</p> <p># Não ingerir nenhum outro suco durante o estudo;</p>							

ANEXO 5

Modelo do recordatório alimentar de 24 horas

Nome: _____ Data: ____/____/____ Coleta: 1ª 2ª 3ª

Horário Local	Descrição do Alimento	Medidas caseiras	Medidas g/ml	Obs.:
_____ _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____	
_____ _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____	
_____ _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____	
_____ _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____	
_____ _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____	
_____ _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____	

ANEXO 6

Modelo de questionário de frequência alimentar semi-quantitativo

Grupo de Alimentos	Com que frequência você costuma comer?		Qual o tamanho de sua porção em relação à porção média?	
	Quantas vezes você come:	Unidade	Porção média	Sua Porção
Alimentos e preparações (Lasanha, bife, alface, etc.)	Número de vezes: 1, 2, 3, ..., 10. (N = nunca ou raramente comeu no último ano)	D = por dia S = por semana M = por mês A = por ano	Porção média de referência	P = menor que a porção média M = igual à porção média G = maior que a porção média E = bem maior que a porção média

Grupo de Alimentos	Quantas vezes você come:										Unidade				Porção média (M)	Sua Porção				
Massas e sopas	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	Medida caseira média (g/mL)	P	M	G	E
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Carnes e peixes	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	Medida caseira média (g/mL)	P	M	G	E
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Leites e derivados	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	Medida caseira média (g/mL)	P	M	G	E
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Leguminosas e ovos	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	Medida caseira média (g/mL)	P	M	G	E
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Arroz e tubérculos	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	Medida caseira média (g/mL)	P	M	G	E
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Verduras e legumes	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	Medida caseira média (g/mL)	P	M	G	E
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Molhos e temperos	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	Medida caseira média (g/mL)	P	M	G	E
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Frutas	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	Medida caseira média (g/mL)	P	M	G	E
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	Medida caseira média (g/mL)	P	M	G	E

Bebidas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pães, biscoitos e cereais	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	Medida caseira média (g/mL)	P	M	G	E									
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>										
Doces e sobremesas	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	Medida caseira média (g/mL)	P	M	G	E									
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>										
Alimentos não mencionados	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	Medida caseira média (g/mL)	P	M	G	E									
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>										

ANEXO 7

Lista de microRNA plasmáticos analisados no estudo

miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR Custom Pick and Mix Panel Plasma – Qiagen

microRNA	Sequência Genética	microRNA	Sequência Genética
hsa-miR-652-3p	AAUGGCGCCACUAGGGU UGUG	hsa-let-7i-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUG CUGUU
hsa-miR-181a-5p	AACAUUCAACGCUGUCG GUGAGU	hsa-miR-26b-5p	UUCAAGUAAUUCAGGAU AGGU
hsa-miR-221-3p	AGCUACAUUGUCUGCUG GGUUUC	hsa-miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUUAGCUG GUUGU
hsa-let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUA UAGUU	hsa-miR-320b	AAAAGCUGGGUUGAGAG GGCAA
hsa-miR-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGUU CUGC	hsa-miR-590-5p	GAGCUUUAUCAUAAAAG UGCAG
hsa-miR-374b-5p	AUAUAAUACAACCGUCU AAGUG	hsa-miR-191-5p	CAACGGAAUCCCAAAGC AGCUG
hsa-miR-93-5p	CAAAGUGCUGUUCGUGC AGGUAG	hsa-miR-99a-5p	AACCCGUAGAUCCGAUC UUGUG
hsa-miR-200a-3p	UAACACUGUCUGGUAAC GAUGU	hsa-miR-301a-3p	CAGUGCAAUAGUAUUGU CAAAGC
hsa-miR-484	UCAGGCUCAGUCCCCUC CCGAU	hsa-miR-151a-5p	UCGAGGAGCUCACAGUC UAGU
hsa-miR-106a-5p	AAAAGUGCUIACAGUGC AGGUAG	hsa-miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGU GUUUG
hsa-miR-145-5p	GUCCAGUUUCCAGGA AUCCCU	hsa-miR-423-5p	UGAGGGGCAGAGAGCGA GACUUU
hsa-miR-185-5p	UGGAGAGAAAGGCAGUU CCUGA	hsa-miR-101-3p	UACAGUACUGUGAUAAAC UGAA
hsa-miR-486-5p	UCCUGUACUGAGCUGCC CCGAG	hsa-miR-365a-3p	UAAUGCCCCUAAAAUCC UUUU
hsa-miR-26a-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAU AGGCU	hsa-miR-23a-3p	AUCACAUUGCCAGGGAU UUCC
hsa-miR-143-3p	UGAGAUGAAGCACUGUA GCUC	hsa-miR-215	AUGACCUAUGAAUUGAC AGAC
hsa-miR-30a-5p	UGUAAACAUCUCGACU GGAAG	hsa-miR-320a	AAAAGCUGGGUUGAGAG GGCGA
hsa-miR-222-3p	AGCUACAUCUGGCUACU GGGU	hsa-miR-338-3p	UCCAGCAUCAGUGAUUU UGUUG
hsa-miR-342-3p	UCUCACACAGAAUUCGC ACCCGU	hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUA CCCCA
hsa-miR-324-5p	CGCAUCCCCUAGGGCAU UGGUGU	hsa-miR-103a-3p	AGCAGCAUUGUACAGGG CUAUGA
hsa-let-7e-5p	UGAGGUAGGAGGUUGU AUAGUU	hsa-miR-331-3p	GCCCCUGGGCCUAUCCU AGAA
hsa-miR-139-5p	UCUACAGUGCACGUGUC UCCAGU	hsa-miR-142-3p	UGUAGUGUUCCUACUU UAUGGA
hsa-miR-375	UUUGUUCGUUCGGCUC GCGUGA	hsa-let-7d-3p	CUAUACGACCUGCUGCC UUUCU
hsa-miR-451a	AAACCGUUACCAUUACU GAGUU	hsa-miR-605	UAAAUCCCAUGGUGCCU UCUCCU
hsa-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUA UAGUU	hsa-miR-19a-3p	UGUGCAAUUCUAUGCAA AACUGA
hsa-miR-128	UCACAGUGAACCGGUCU CUUU	hsa-miR-144-3p	UACAGUAUAGAUGAUGU ACU

hsa-miR-125 ^a -5p	UCCUGAGACCCUUUAA CCUGUGA	hsa-miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUA AUGCG
hsa-miR-485-3p	GUCAUACACGGCUCUCC UCUCU	hsa-miR-148 ^a -3p	UCAGUGCACUACAGAAC UUUGU
hsa-let-7b-3p	CUAUACAACCUACUGCC UUCCC	hsa-miR-10b-5p	UACCCUGUAGAACCGAA UUUGUG
hsa-miR-25-3p	CAUUGCACUUGUCUCGG UCUGA	hsa-miR-195-5p	UAGCAGCACAGAAAUUU GGC
hsa-miR-33 ^a -5p	GUGCAUUGUAGUUGCAU UGCA	hsa-miR-125b-5p	UCCUGAGACCCUAACU UGUGA
hsa-miR-16-5p	UAGCAGCACGUAAAUAU UGGCG	hsa-miR-192-5p	CUGACCUAUGAAUUGAC AGCC
hsa-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGGUUGU GUGGUU	hsa-miR-18b-5p	UAAGGUGCAUCUAGUGC AGUUAG
hsa-miR-152	UCAGUGCAUGACAGAAC UUGG	hsa-miR-335-5p	UCAAGAGCAAUAACGAAA AAUGU
hsa-miR-30c-5p	UGUAAACAUCUACACU CUCAGC	hsa-miR-204-5p	UUCUUUUGUCAUCCUA UGCCU
hsa-miR-197-3p	UUCACCACCUUCUCCAC CCAGC	hsa-let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUA CAGUU
hsa-miR-99b-5p	CACCCGUAGAACCGACC UUGCG	hsa-miR-22-3p	AAGCUGCCAGUUGAAGA ACUGU
hsa-miR-30e-5p	UGUAAACAUCUUGACU GGAAG	hsa-miR-199 ^a -3p	ACAGUAGUCUGCACAUU GGUUA
hsa-miR-146 ^a -5p	UGAGAACUGAAUCCAU GGGUU	hsa-miR-19b-3p	UGUGCAAUCCAUGCAA AACUGA
hsa-miR-424-5p	CAGCAGCAAUUCAUGUU UUGAA	hsa-miR-29 ^a -3p	UAGCACCAUCUGAAAUC GGUUA
hsa-miR-107	AGCAGCAUUGUACAGGG CUAUGA	hsa-miR-150-5p	UCUCCCAACCCUUGUAC CAGUG
hsa-miR-148b-3p	UCAGUGCAUCACAGAAC UUUGU	hsa-miR-30b-5p	UGUAAACAUCUACACUC AGCU
hsa-miR-20 ^a -5p	UAAAGUGCUUAUAGUGC AGGUAG	hsa-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGG AACAG
hsa-miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGC AGGUAG	hsa-miR-502-3p	AAUGCACCUGGGCAAGG AUUCA
hsa-miR-30d-5p	UGUAAACAUCUCCGACU GGAAG	hsa-miR-339-3p	UGAGCGCCUCGACGACA GAGCCG
hsa-miR-186-5p	CAAAGAAUUCUCCUUU GGCU	hsa-miR-409-3p	GAAUGUUGCUCGGUGAA CCCU

microRNA	Sequência Genética	microRNA	Sequência Genética
hsa-miR-154-5p	UAGGUUAUCCGUGUU GCCUUCG	hsa-miR-378 ^a -3p	ACUGGACUUGGAGUCA GAAGG
hsa-miR-155-5p	UUAAUGCUAAUCGUGA UAGGGGU	hsa-miR-425-5p	AAUGACACGAUCACUC CCGUUGA
hsa-miR-140-3p	UACCACAGGGUAGAAC CACGG	hsa-miR-346	UGUCUGCCCCGCAUGCC UGCCUCU
hsa-miR-92b-3p	UAUUGCACUCGUCCC GGCCUCC	hsa-miR-193b-3p	AACUGGCCCUCAAAGU CCCGCU
hsa-miR-505-3p	CGUCAACACUUGCUG GUUCCU	hsa-miR-885-5p	UCCAUUACACUACCCU GCCUCU
hsa-miR-23b-3p	AUCACAUUGCCAGGG AUUCC	hsa-miR-127-3p	UCGGAUCCGUCUGAGC UUGGCU
hsa-miR-141-3p	UAACACUGUCUGGUAA AGAUGG	hsa-miR-208 ^a	AUAAGACGAGCAAAAAG CUUGU
hsa-miR-10 ^a -5p	UACCCUGUAGAUCGG AAUUUGUG	hsa-miR-16-2-3p	CCAUAUUACUGUGCU GCUUUA
hsa-miR-27 ^a -3p	UUCACAGUGGCUAAG UCCGC	hsa-miR-140-5p	CAGUGGUUUUACCCUA UGGUAG
hsa-miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGU AUGUAU	hsa-miR-130b-3p	CAGUGCAAUGAUGAAA GGGCAU
hsa-miR-382-5p	GAAGUUGUUCGUGGU GGAUUCG	hsa-miR-20 ^a -3p	ACUGCAUUAUGAGCAC UUAAG
hsa-miR-32-5p	UAUUGCACAUUACUAA GUUGCA	hsa-miR-629-5p	UGGUUUUACGUUGGGA GAACU
hsa-miR-133b	UUUGGUCCCCUUCAA CCAGCUG	hsa-miR-200c-3p	UAAUACUGCCGGUAA UGAUGGA
hsa-let-7d-5p	AGAGGUAGUAGGUUG CAUAGUU	hsa-miR-501-3p	AAUGCACCCGGGCAAG GAUUCU
hsa-miR-133 ^a	UUUGGUCCCCUUCAA CCAGCUG	hsa-miR-423-3p	AGCUCGGUCUGAGGCC CCUCAGU
hsa-miR-20b-5p	CAAAGUGCUCUAAGU GCAGGUAG	hsa-miR-376 ^a -3p	AUCAUAGAGGAAAAUCC ACGU
hsa-miR-328	CUGGCCUCUCUGCC CUUCCGU	hsa-miR-22-5p	AGUUCUUCAGUGGCAA GCUUUA
hsa-miR-532-3p	CCUCCACACCCAAGG CUUGCA	hsa-miR-2110	UUGGGGAAACGGCCGC UGAGUG
hsa-miR-15 ^a -5p	UAGCAGCACAUAAUGG UUUGUG	hsa-miR-361-3p	UCCCCAGGUGUGAUU CUGAUUU
hsa-miR-532-5p	CAUGCCUUGAGUGUA GGACCGU	hsa-miR-93-3p	ACUGCUGAGCUAGCAC UUCCCG
hsa-miR-194-5p	UGUAACAGCAACUCCA UGUGGA	hsa-miR-144-5p	GGAUUAUCAUAUAC UGUAAG
hsa-miR-660-5p	UACCCAUUGCAUAUCG GAGUUG	hsa-miR-210	CUGUGCGUGACAGC GJCUGA
hsa-miR-574-3p	CACGCUCAUGCACACA CCCACA	hsa-miR-199 ^a -5p	CCCAGUGUUCAGACUA CCUGUUC
hsa-miR-551b-3p	GCGACCCAUAUCUUGG UUUCAG	hsa-miR-766-3p	ACUCCAGCCCCACAGC CUCAGC
hsa-miR-130 ^a -3p	CAGUGCAAUGUUAAAA GGGCAU	hsa-miR-584-5p	UUAUGGUUUGCCUGGG ACUGAG
hsa-miR-28-5p	AAGGAGCUCACAGUC UAUUGAG	hsa-miR-92 ^a -3p	UAUUGCACUUGUCCCG GCCUGU
hsa-miR-497-5p	CAGCAGCACACUGUG GUUUGU	hsa-miR-363-3p	AAUUGCACGGUAUCCA UCUGUA
hsa-miR-425-3p	AUCGGGAAUGUCGUG UCCGCC	hsa-miR-374 ^a -5p	UUAUAAUACAACCUGAU AAGUG
hsa-miR-132-3p	UAACAGUCUACAGCCA UGGUCG	hsa-miR-190 ^a	UGAUUAUGUUUGAUUA UUAGGU

hsa-let-7c	UGAGGUAGUAGGUUG UAUGGUU	hsa-miR-29a-5p	ACUGAUUUUCUUUUGGU GUUCAG
hsa-miR-18a-5p	UAAGGUGCAUCUAGU GCAGAUAG	hsa-miR-18a-3p	ACUGCCCUAAGUGCUC CUUCUGG
hsa-miR-29b-3p	UAGCACCAUUUGAAAU CAGUGUU	hsa-miR-151a-3p	CUAGACUGAAGCUCCU UGAGG
hsa-miR-136-5p	ACUCCAUUUGUUUUG AUGAUGGA	hsa-miR-28-3p	CACUAGAUUGUGAGCU CCUGGA
hsa-let-7i-3p	CUGCGCAAGCUACUG CCUUGCU	hsa-miR-324-3p	ACUGCCCCAGGUGCUG CUGG
hsa-miR-106b-5p	UAAAGUGCUGACAGU GCAGAU	hsa-miR-182-5p	UUUGGCAAUGGUAGAA CUCACACU
hsa-miR-15b-3p	CGAAUCAUUUUUGCU GCUCUA	hsa-miR-15b-5p	UAGCAGCACAUCAUGG UUUACA
hsa-miR-142-5p	CAUAAAGUAGAAAGCA CUACU	hsa-miR-106b-3p	CCGCACUGUGGGUACU UGCUGC
hsa-miR-296-5p	AGGGCCCCCCCUCAA UCCUGU	hsa-miR-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAAU CGGUUA
hsa-miR-326	CCUCUGGGCCCUUCC UCCAG	hsa-miR-95	UUCAACGGGUUUUUU UGAGCA
hsa-miR-421	AUCAACAGACAUUAAU UGGGCGC	hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGA UGUUGA
hsa-miR-223-5p	CGUGUAUUUGACAAG CUGAGUU	hsa-miR-30e-3p	CUUUCAGUCGGAUGUU UACAGC
hsa-miR-146b-5p	UGAGAACUGAAUCCA UAGGCU	hsa-miR-543	AAACAUUCGCGGUGCA CUUCUU
hsa-miR-205-5p	UCCUUCAUCCACCG GAGUCUG	hsa-miR-29b-2-5p	CUGGUUUCACAUGGUG GCUUAG
hsa-miR-339-5p	UCCUGUCCUCCAGG AGCUCACG	hsa-miR-495-3p	AAACAAACAUGGUGCAC UUCUU
hsa-miR-500a-5p	UAAUCCUUGCUCUCCU GGGUGAGA		

ANEXO 8

Lista de microRNA de PBMC analisados no estudo

miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR Custom Pick and Mix Panel PBMC – Qiagen

microRNA	Sequência Genética	microRNA	Sequência Genética
hsa-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGU AUAGUU	hsa-miR-183-5p	UAUGGCACUGGUAGAA UUCACU
hsa-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGGUUGU GUGGUU	hsa-miR-185-5p	UGGAGAGAAAGGCAGU UCCUGA
hsa-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGU AUGGUU	hsa-miR-186-5p	CAAAGAAUUCUCCUUU UGGGCU
hsa-let-7d-5p	AGAGGUAGUAGGUUGC AUAGUU	hsa-miR-18b-5p	UAAGGUGCAUCUAGUG CAGUUAG
hsa-let-7e-5p	UGAGGUAGGAGGUUGU AUAGUU	hsa-miR-195-5p	UAGCAGCACAGAAUUAU UGGC
hsa-let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGU AUAGUU	hsa-miR-199a-5p	CCCAGUGUUCAGACUA CCUGUUC
hsa-let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUUGU ACAGUU	hsa-miR-19a-3p	UGUGCAAUUCUAUGCA AAACUGA
hsa-let-7i-5p	UGAGGUAGUAGUUUGU GCUGUU	hsa-miR-19b-3p	UGUGCAAUCCAUGCA AAACUGA
hsa-miR-100-5p	AACCCGUAGAUCGAA CUUGUG	hsa-miR-202-3p	AGAGGUUAUAGGGCAUG GGAA
hsa-miR-101-3p	UACAGUACUGUGAUAA CUGAA	hsa-miR-206	UGGAAUGUAAGGAAGU GUGUGG
hsa-miR-103a-3p	AGCAGCAUUGUACAGG GCUAUGA	hsa-miR-208a-3p	AUAAGACGAGCAAAAAG CUUGU
hsa-miR-106b-5p	UAAAGUGCUGACAGUG CAGAU	hsa-miR-208b-3p	AUAAGACGAACAAAAGG UUUGU
hsa-miR-107	AGCAGCAUUGUACAGG GCUAUCA	hsa-miR-20a-5p	UAAAGUGCUIUAUAGUG CAGGUAG
hsa-miR-10b-5p	UACCCUGUAGAACCGA AUUUGUG	hsa-miR-20b-5p	CAAAGUGCUCUAGUG CAGGUAG
hsa-miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGG UGUUUG	hsa-miR-210-3p	CUGUGCGUGUGACAGC GGCUGA
hsa-miR-124-3p	UAAGGCACGCGGUGAA UGCC	hsa-miR-211-5p	UUCCCUUUGUCAUCCU UCGCCU
hsa-miR-125a-5p	UCCUGAGACCCUUUA ACCUUGUGA	hsa-miR-214-3p	ACAGCAGGCACAGACA GGCAGU
hsa-miR-125b-5p	UCCUGAGACCCUAAC UUGUGA	hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGA UGUUGA
hsa-miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAU AAUGCG	hsa-miR-221-3p	AGCUACAUCUGUCUGCU GGGUUUC
hsa-miR-128-3p	UCACAGUGAACCGGUC UCUUU	hsa-miR-222-3p	AGCUACAUCUGGCUAC UGGGU
hsa-miR-130a-3p	CAGUGCAAUGUUAAAA GGGCAU	hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAU ACCCCA
hsa-miR-130b-3p	CAGUGCAAUGAUGAAA GGGCAU	hsa-miR-22-3p	AAGCUGCCAGUUGAAG AACUGU
hsa-miR-1324	CCAGACAGAAUUCUUAU GCACUUUC	hsa-miR-224-5p	CAAGUCACUAGUGGUU CCGUU
hsa-miR-133a-3p	UUUGGUCCCCUUCAAC CAGCUG	hsa-miR-23a-3p	AUCACAUUGCCAGGGA UUUCC

hsa-miR-133b	UUUGGUCCCCUUCAAC CAGCUA	hsa-miR-23b-3p	AUCACAUUGCCAGGGA UUACC
hsa-miR-1-3p	UGGAAUGUAAAGAAGU AUGUAU	hsa-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAG GAACAG
hsa-miR-140-5p	CAGUGGUUUUACCCUA UGGUAG	hsa-miR-25-3p	CAUUGCACUUGUCUCG GUCUGA
hsa-miR-142-3p	UGUAGUGUUUCCUACU UUAUGGA	hsa-miR-26a-5p	UUCAAGUAAUCCAGGA UAGGCU
hsa-miR-143-3p	UGAGAUGAAGCACUGU AGCUC	hsa-miR-26b-5p	UUCAAGUAAUUCAGGA UAGGU
hsa-miR-144-3p	UACAGUAUAGAUGAUG UACU	hsa-miR-27a-3p	UUCACAGUGGCUAAGU UCCGC
hsa-miR-145-5p	GUCCAGUUUCCCAGG AAUCCCU	hsa-miR-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGU UCUGC
hsa-miR-146a-5p	UGAGAACUGAAUCCA UGGGUU	hsa-miR-29a-3p	UAGCACCAUGGAAAU CGGUUA
hsa-miR-149-5p	UCUGGCUCGUGUCUU CACUCCC	hsa-miR-29b-3p	UAGCACCAUUUGAAAU CAGUUU
hsa-miR-150-5p	UCUCCCAACCCUUGUA CCAGUG	hsa-miR-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAAU CGGUUA
hsa-miR-155-5p	UUAAUGCUAAUCGUGA UAGGGGU	hsa-miR-300	UAUACAAGGGCAGACU CUCUCU
hsa-miR-15a-5p	UAGCAGCACAUAAUGG UUUGUG	hsa-miR-301a-3p	CAGUGCAAUAGUAUUG UCAAAGC
hsa-miR-15b-5p	UAGCAGCACAUCAUGG UUUACA	hsa-miR-301b-3p	CAGUGCAAUGAUUUG UCAAAGC
hsa-miR-16-5p	UAGCAGCACGUAAAUA UUGGCG	hsa-miR-302a-3p	UAAGUGCUUCCAUGUU UUGGUGA
hsa-miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUG CAGGUAG	hsa-miR-302b-3p	UAAGUGCUUCCAUGUU UUAGUAG
hsa-miR-181a-5p	AACAUUCAACGCUGUC GGUGAGU	hsa-miR-302c-3p	UAAGUGCUUCCAUGUU UCAGUGG
hsa-miR-181b-5p	AACAUUCAUUGCUGUC GGUGGGU	hsa-miR-30a-5p	UGUAAACAUCCUCGAC UGGAAG
hsa-miR-181c-5p	AACAUUCAACUGUCG GUGAGU	hsa-miR-30b-5p	UGUAAACAUCCUACACU CAGCU
hsa-miR-181d-5p	AACAUUCAUUGUUGUC GGUGGGU	hsa-miR-30c-5p	UGUAAACAUCCUACACU CUCAGC
hsa-miR-182-5p	UUUGGCAAUGGUAGAA CUCACACU	hsa-miR-30d-5p	UGUAAACAUCCCGAC UGGAAG
hsa-miR-182-5p	UUUGGCAAUGGUAGAA CUCACACU	hsa-miR-30d-5p	UGUAAACAUCCCGAC UGGAAG

microRNA	Sequência Genética	microRNA	Sequência Genética
hsa-miR-30e-5p	UGUAAACAUCCUUGACUGGAA G	hsa-miR-93-5p	CAAAGUGCUGUUCGUGCAG GUAG
hsa-miR-31-5p	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	hsa-miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGU AUGA
hsa-miR-320a	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGC GA	hsa-miR-98-5p	UGAGGUAGUAAGUUGUAUU GUU
hsa-miR-328-3p	CUGGCCUCUCUGCCCUUCC GU	hsa-miR-99a-5p	AACCCGUAGAUCCGAUCUU GUG
hsa-miR-340-5p	UUAUAAAGCAAUGAGACUGAU U	hsa-miR-520e	AAAGUGCUIUCCUUUUUGAG GG
hsa-miR-342-3p	UCUCACACAGAAAUCGCACCC GU	hsa-miR-524-5p	CUACAAAGGGAAGCACUUUC UC
hsa-miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUU GU	hsa-miR-543	AAACAUUCGCGGUGCACUU CUU
hsa-miR-34c-5p	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAU UGC	hsa-miR-545-3p	UCAGCAAACAUUUUUGUGU GC
hsa-miR-365a-3p	UAAUGCCCUAAAAUCCUUA U	hsa-miR-548c-3p	CAAAAAUCUCAUUUACUUUU GC
hsa-miR-372-3p	AAAGUGCUGCGACAUUUGAGC GU	hsa-miR-548d-3p	CAAAAACCACAGUUUCUUUU GC
hsa-miR-373-3p	GAAGUGCUUCGAUUUUGGGG UGU	hsa-miR-548e-3p	AAAACUGAGACUACUUUUG CA
hsa-miR-374a-5p	UUAUAAUACAACCUGAUAAAGU G	hsa-miR-590-5p	GAGCUUAUUCAUAAAAGUGC AG
hsa-miR-378a-3p	ACUGGACUUGGAGUCAGAAG GC	hsa-miR-607	GUUCAAAUCCAGAUCUAUAA C
hsa-miR-381-3p	UAUACAAGGGCAAGCUCUCUG U	hsa-miR-655-3p	AUAUACAUGGUUAAACCUCU UU
hsa-miR-410-3p	AAUAUAACACAGAUGGCCUGU	hsa-miR-656-3p	AAUAUUUACAGUCAACCUC U
hsa-miR-423-3p	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUC AGU	hsa-miR-7-5p	UGGAAGACUAGUGAUUUUG UUGU
hsa-miR-424-5p	CAGCAGCAAUUC AUGUUUUGA A	hsa-miR-875-3p	CCUGGAAACACUGAGGUUG UG
hsa-miR-449a	UGGCAGUGUAUUGUUAGCUG GU	hsa-miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGGCC UGU
hsa-miR-449b-5p	AGGCAGUGUAUUGUUAGCUG GC	hsa-miR-182-5p	UUUGGCAAUGGUAGAACUC ACACU
hsa-miR-451a	AAACCGUUACCAUUACUGAGU U		
hsa-miR-454-3p	UAGUGCAAUAUUGCUUAUAGG GU		
hsa-miR-486-5p	UCCUGUACUGAGCUGCCCCG AG		
hsa-miR-494-3p	UGAAACAUACACGGGAAACCU C		
hsa-miR-497-5p	CAGCAGCACACUGUGGUUUG U		
hsa-miR-499a-5p	UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU GUGUCUUUUGCUCUGCAGUC		
hsa-miR-511-5p	A		
hsa-miR-513b-5p	UUCACAAGGAGGUGUCAUUUA U		
hsa-miR-519c-3p	AAAGUGCAUCUUUUUAGAGGA U		
hsa-miR-519d-3p	CAAAGUGCCUCCCUUAGAGU G		
hsa-miR-520d-3p	AAAGUGCUCUCUUUGGUGG GU		

