

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Efeito crônico da ingestão de suco de laranja sanguínea
sobre o perfil de expressão de microRNA e resposta
inflamatória em mulheres com sobrepeso**

Vinícius Cooper Capetini

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Nutrição em Saúde Pública para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Nutrição em Saúde
Pública

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo
Rogerio

**São Paulo
2021**

Efeito crônico da ingestão de suco de laranja sanguínea sobre o perfil de expressão de microRNA e resposta inflamatória em mulheres com sobrepeso

Vinícius Cooper Capetini

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Nutrição em Saúde Pública para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero

**Versão revisada
São Paulo
2021**

RESUMO

Capetini, V. C. **Efeito crônico da ingestão de suco de laranja sanguínea sobre o perfil de expressão de microRNA e resposta inflamatória em mulheres com sobrepeso**. 2021. Tese - Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, 2021.

Introdução: A obesidade está diretamente envolvida na etiologia de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). A ingestão excessiva de nutrientes associada à obesidade culmina na ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias em diferentes locais do organismo, acarretando uma inflamação sistêmica, crônica e de baixa intensidade. microRNA (miRNA) atuam como moduladores e biomarcadores de processos inflamatórios e a análise da sua expressão pode contribuir para identificação do risco de DCNT. A laranja (*Citrus sinensis*) é a fruta mais produzida no Brasil, contendo concentrações significantes de flavonoides, vitamina C e carotenoides, os quais apresentam atividade antioxidante e anti-inflamatória. Neste contexto, destaca-se a laranja sanguínea, que além dos compostos nutricionais comuns em *Citrus*, contem antocianinas. **Objetivo:** Investigar o efeito da ingestão crônica de suco de laranja sanguínea Moro sobre a resposta inflamatória e o perfil de expressão de miRNA no plasma e em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em mulheres com sobrepeso. **Métodos:** Estudo de intervenção crônica em mulheres (n = 20) de 18 a 40 anos, diagnosticadas com sobrepeso (índice de massa corporal = 25,0 a 29,9 kg/m²). Durante quatro semanas, as voluntárias ingeriram, diariamente, 500 mL de suco de laranja sanguínea Moro, com colheitas de sangue realizadas nos momentos basal e após 2 e 4 semanas do início do protocolo experimental. Foram realizadas as seguintes análises: caracterização do suco de laranja sanguínea Moro; avaliação antropométrica; aferição da pressão arterial; avaliação do consumo alimentar; determinação das concentrações plasmáticas de glicose, insulina, lipopolissacarídeos, proteína ligadora de lipopolissacarídeo, *cluster* de diferenciação 14 solúvel, biomarcadores inflamatórios [interleucina (IL)-6, IL-10, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), proteína quimiotática de monócitos-1, molécula de adesão intercelular solúvel (sICAM)-1 e a molécula de adesão celular vascular solúvel (sVCAM)-1]; e determinação das concentrações séricas do perfil lipídico, proteína C reativa, fibrinogênio, D-dímero, gama glutamil transferase, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, amilase, ureia, creatinina e minerais. Foram também analisadas a expressão de miRNA no plasma e em PBMC; a expressão dos genes *TNF*, fator nuclear kappa B subunidade p50 (*NFKB1*), NF- κ B subunidade p65 (*RELA*), inibidor alfa do NF- κ B (*NFKBIA*), *IL1*, *IL6*, *IL10*, e receptores do tipo toll (*TLR2* e *TLR4*); e o conteúdo e a fosforilação das proteínas NF- κ B, I κ B- α , quinase c-Jun N-terminal (JNK), quinase beta inibidora do I κ B- α (IKK- β) e fator de transformação de crescimento beta 1 (TAK1). **Resultados:** A ingestão do suco de laranja sanguínea Moro aumentou o consumo de vitamina C ($p < 0,001$), a razão fosfo-JNK/JNK ($p < 0,05$) e a expressão de miRNA no plasma [miR-144-3p ($p = 0,02$)] e em PBMC [miR-424-5p ($p = 0,002$), miR-144-3p ($p = 0,006$) e miR-130b-3p ($p = 0,03$)]. Por outro lado, diminuiu o conteúdo proteico de NF- κ B ($p < 0,05$) e a expressão do let-7f-5p ($p = 0,007$) e do miR-126-3p ($p = 0,04$) em PBMC. Contudo, não foram observadas alterações significativas na expressão de genes que codificam proteínas envolvidas com a resposta inflamatória e nos parâmetros antropométricos e bioquímicos analisados ao final do protocolo experimental. **Conclusão:** A ingestão do suco de laranja sanguínea modula a expressão de miRNA em PBMC e no plasma

e diminuí o conteúdo proteico de NF-κB em PBMC, sem alterar a ingestão calórica, os parâmetros antropométricos e os biomarcadores metabólicos avaliados.

Descritores: microRNA, inflamação, laranja sanguínea, sobrepeso, flavonoides.

ABSTRACT

Capetini, V. C. [Chronic effect of blood orange juice intake on the microRNA expression profile and inflammatory response in overweight women]. 2021. Thesis - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021. Portuguese.

Introduction: Obesity is directly involved in the etiology of chronic non-communicable diseases (NCD). The excessive intake of nutrients associated with obesity culminates in the activation of pro-inflammatory signaling pathways in different parts of the body, causing systemic, chronic, and low-intensity inflammation. microRNA (miRNA) act as modulators and biomarkers of inflammatory processes and the analysis of their expression can contribute to the identification of the risk of NCDs. Orange (*Citrus sinensis*) is the most produced fruit in Brazil, containing significant concentrations of flavonoids, vitamin C, and carotenoids, which have antioxidant and anti-inflammatory activity. In this context, blood orange stands out, which in addition to the common nutritional compounds in *Citrus*, it has anthocyanins.

Objective: To investigate the effect of chronic Moro blood orange juice intake on the inflammatory response and miRNA expression profile in plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in overweight women. **Methods:** Chronic intervention study in women (n = 20) aged 18 to 40 years old, diagnosed with overweight (body mass index = 25.0 to 29.9 kg/m²). For four weeks, the volunteers ingested, daily, 500 mL of Moro blood orange juice, with blood samples collected at baseline and 2 and 4 weeks after the beginning of the experimental protocol. The following analyses were carried out: characterization of Moro blood orange juice; anthropometric measurements; blood pressure measurement; dietary intake assessment; determination of plasma concentrations of glucose, insulin, lipopolysaccharides, lipopolysaccharide-binding protein, soluble cluster of differentiation 14, and inflammatory biomarkers [interleukin (IL)-6, IL-10, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), monocyte chemoattractant protein-1, soluble intercellular adhesion molecule (sICAM)-1 and soluble vascular cell adhesion molecule (sVCAM)-1]; and determination of serum concentrations of lipid profile, C-reactive protein, fibrinogen, D-dimer, gamma-glutamyl transferase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, amylase, urea, creatinine, and minerals. Were also analyzed the expression of miRNA in plasma and PBMC; the expression of genes *TNF*, nuclear factor kappa B p50 subunit (*NFKB1*), NF- κ B p65 subunit (*RELA*), NF- κ B inhibitor alpha (*NFKBIA*), *IL1*, *IL6*, *IL10*, and toll-like receptors (*TLR2* e *TLR4*); and the content and phosphorylation of proteins NF- κ B, I κ B α , c-Jun N-terminal kinase (JNK), inhibitor of NF- κ B kinase subunit beta (IKK β) and transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK1). **Results:** Moro blood orange juice intake increased vitamin C consumption ($p < 0.001$), phospho-JNK/JNK ratio ($p < 0.05$), and miRNA expression in plasma [miR-144-3p ($p = 0.02$)] and in PBMC [miR-424-5p ($p = 0.002$), miR-144-3p ($p = 0.006$), and miR-130b-3p ($p = 0.03$)]. Conversely, it decreased the protein content of NF- κ B ($p < 0.05$) and the expression of let-7f-5p ($p = 0.007$) and miR-126-3p ($p = 0.04$) in PBMC. However, no significant changes were observed in the expression of genes that encode proteins involved in the inflammatory response and the anthropometric and biochemical parameters analyzed at the end of the experimental protocol. **Conclusion:** Ingestion of blood orange juice modulates miRNA expression in PBMC and plasma and decreases the protein content of NF- κ B in PBMC,

without changing caloric intake, anthropometric parameters, and metabolic biomarkers evaluated.

Keywords: microRNA, inflammation, blood orange, overweight, flavonoids.