

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**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a) Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

Capetini, Vinícius Cooper

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; orientador Marcelo Macedo Rogero. -- São Paulo, 2021.

123 p.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2021.

1. microRNA. 2. inflamação. 3. laranja sanguínea. 4. sobrepeso. 5. flavonoides. I. Macedo Rogero, Marcelo, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus, quis ut Deus?;

Aos meus pais, Viena e Dailton, minha irmã Daiana e demais familiares, que estiveram ao meu lado durante essa trajetória;

À Universidade de São Paulo (USP), em especial, a Faculdade de Saúde Pública (FSP) e o Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), pelas oportunidades e o conhecimento adquirido, me permitindo avistar um horizonte jamais imaginado;

Ao meu orientador, professor Dr. Marcelo Rogero, pela orientação, dedicação, ensinamentos, confiança e todas as oportunidades que me impulsionaram;

Ao professor Dr. Fernando Abdulkader, quem me ensinou os primeiros passos da pesquisa científica;

À professora Dra. Helena Ximenes e todos os outros professores, com os quais tive a oportunidade de aprender e me inspirar ao longo da minha formação;

Ao professor Dr. Ricardo Fock, Edson Makiyama, Dalila de Oliveira e Araceli Hastreiter, pela colaboração com as análises bioquímicas e ensinamentos técnicos;

À professora Dra. Neuza Hassimotto e Alessandra Nishioka, pela colaboração com a análise do suco de laranja sanguínea Moro;

À professora Dra. Ludmila Ferreira e Dr. Frederico Ferreira, pela colaboração com a análise de microRNA;

A Bruna Quintanilha, pelos ensinamentos, amizade e parceria em todo o projeto;

À Dra. Geni Sampaio, pelos ensinamentos, colaboração e auxílio técnico;

À Dra. Andrea Bonvini, Dra. Marina Norde e demais membros do laboratório de genômica nutricional e inflamação (GENUIM), pelo auxílio e o conhecimento compartilhado;

À Sra. Alessandra, Sra. Cidinha e demais colaboradores da secretaria de pós-graduação da FSP/USP, por todo o suporte acadêmico;

À Dra. Rosana Freitas, Dra. Liania Alves e demais colaboradores do departamento de Nutrição da FSP/USP, por todo o suporte técnico;

À Sra. Natália Crispim e demais colaboradores da Superintendência de Assistência Social (SAS) da USP, pela assistência durante esse período;

Às voluntárias que gentilmente participaram do estudo, com a adesão ao protocolo experimental e a doação do tempo, amostras e dados necessários para a realização do estudo;

À Sra. Conceição, Sra. Jucileide e Sra. Maria Soares do Centro de Saúde Escola Geraldo de Paula Souza da FSP/USP, pela colaboração com o recrutamento das voluntárias e coleta de amostras;

Ao Sr. Edmilson Trevizan, pela entrega do suco para as voluntárias;

À Fundecitrus, pela doação do suco de laranja sanguínea Moro;

À professora Dra. Bernadette Gombossy e demais colaboradores do *Food Research Center* (FORC), pelo suporte técnico e financeiro do projeto;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento concedido;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos financiamentos concedidos (Bolsa de doutorado – processo nº 2018/25046-7 e Bolsa estágio de pesquisa no exterior (BEPE) – processo nº 2019/23182-3).

“Se você não consegue explicar algo de forma simples é porque você não entendeu bem o suficiente.”

(Albert Einstein)

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.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 DIETA OCIDENTAL, EXCESSO DE PESO E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS.....	19
1.2 INFLAMAÇÃO METABÓLICA.....	20
1.3 EPIGENÔMICA NUTRICIONAL.....	27
1.4 LARANJA SANGUÍNEA MORO.....	34
1.5 JUSTIFICATIVA.....	39
1.6 HIPÓTESE DO ESTUDO.....	40
2 OBJETIVO.....	41
2.1 OBJETIVO GERAL.....	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	42
3.1.1 Caracterização das participantes.....	43
3.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	44
3.3 SUCO DE LARANJA SANGUÍNEA MORO.....	45
3.3.1 Caracterização do suco de laranja sanguínea Moro.....	45
3.4 PREPARO DO SANGUE.....	50
3.4.1 Separação das células mononucleares.....	51
3.4.2 Análises bioquímicas.....	52
3.4.3 Análise da expressão de mRNA em PBMC por RT-qPCR.....	53
3.4.4 Análise da expressão de miRNA no plasma e em PBMC.....	54
3.4.5 Análise de proteínas por <i>Western Blotting</i>	57
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
4 RESULTADOS.....	60
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	60
4.2 COMPOSIÇÃO DO SUCO DE LARANJA SANGUÍNEA MORO.....	61
4.3 EFEITO DA INGESTÃO DO SUCO DE LARANJA SANGUÍNEA MORO SOBRE O PADRÃO DIETÉTICO.....	65
4.4 EFEITO DA INGESTÃO DO SUCO DE LARANJA SANGUÍNEA MORO SOBRE OS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E PRESSÃO ARTERIAL.....	66
4.5 EFEITO DA INGESTÃO DO SUCO DE LARANJA SANGUÍNEA MORO SOBRE O PERFIL BIOQUÍMICO.....	67

4.6 EFEITO DA INGESTÃO DO SUCO DE LARANJA SANGUÍNEA MORO SOBRE A EXPRESSÃO DE mRNA.....	69
4.7 EFEITO DA INGESTÃO DO SUCO DE LARANJA SANGUÍNEA MORO SOBRE A EXPRESSÃO DE miRNA.....	70
4.7.1 Controle de qualidade da expressão de miRNA no plasma.....	70
4.7.2 Controle de qualidade da expressão de miRNA em PBMC.....	72
4.7.3 Expressão de miRNA no plasma.....	73
4.7.4 Expressão de miRNA em PBMC.....	76
4.7.5 Predição de mRNA alvos.....	79
4.7.6 Análise das redes gênicas.....	80
4.8 EFEITO DA INGESTÃO DO SUCO DE LARANJA SANGUÍNEA MORO SOBRE O CONTEÚDO E FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	81
4.9 EFEITO DA INGESTÃO DO SUCO DE LARANJA SANGUÍNEA MORO SOBRE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS.....	82
5 DISCUSSÃO.....	83
6 CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIA.....	92
ANEXOS.....	108
Anexo 1. Cartaz de divulgação para recrutamento de voluntárias.....	108
Anexo 2. Questionário para a caracterização e a confirmação da adequação das interessadas.....	109
Anexo 3. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	111
Anexo 4. Cronograma das coletas e instruções entregue às voluntárias.....	113
Anexo 5. Recordatório alimentar de 24 horas.....	114
Anexo 6. Valores de referência das análises bioquímicas – Hospital Universitário da USP.....	115
Anexo 7. miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR Custom Pick and Mix Panel Plasma – Exiqon.....	116
Anexo 8. miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR Custom Pick and Mix Panel PBMC – Exiqon.....	118
Anexo 9. <i>Fold-change</i> da expressão gênica de todos os miRNA plasmáticos (n = 8).....	120
Anexo 10. <i>Fold-change</i> da expressão gênica de todos os miRNA em PBMC (n = 8).....	121
CURRÍCULO LATTES.....	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação das vias de sinalização MAPK e NF- κ B por TLR4, TNFR1 e IL-1R.....	25
Figura 2. Biogênese, mecanismo de ação e secreção dos microRNA.....	30
Figura 3. Delineamento do estudo.....	44
Figura 4. Cromatograma obtido por LC-ESI-MS/MS de suco de laranja sanguínea Moro em modo negativo.....	62
Figura 5. Cromatograma obtido por LC-ESI-MS/MS de suco de laranja sanguínea Moro em modo positivo.....	63
Figura 6. Expressão de mRNA da via inflamatória em PBMC de mulheres com sobrepeso, avaliada no período basal e 2 e 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL de suco de laranja sanguínea Moro.....	69
Figura 7. Valores brutos de Cq obtidos para o controle dos ensaios por <i>RNA spike-in 2</i> , 4 e 5 em amostras de plasma (n = 8).....	70
Figura 8. Valores brutos de Cq obtidos para o controle dos ensaios por <i>RNA spike-in 3</i> e 6 em amostras de plasma (n = 20).....	71
Figura 9. Diferença entre os valores de Cq (miR-23a - miR-451a) obtidos para análise de hemólise nas amostras de plasma (n = 8).....	71
Figura 10. Valores brutos de Cq obtidos para o controle dos ensaios por <i>RNA spike-in 6</i> em amostras de PBMC (n = 20).....	72
Figura 11. Valores brutos de Cq obtidos para o controle dos ensaios por <i>RNA spike-in 3</i> em amostras de PBMC (n = 12).....	72
Figura 12. Diagrama do <i>heat map</i> supervisionado dos miRNA expressos no plasma com agrupamento do período basal e após 4 semanas da ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro.....	75
Figura 13. Diagrama do <i>heat map</i> supervisionado dos miRNA expressos em PBMC com agrupamento do período basal e após 4 semanas da ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro.....	78
Figura 14. Alvos dos miRNA alterados em PBMC ($p < 0,05$), após ingestão diária de 500 mL de suco de laranja Moro por 4 semanas.....	80
Figura 15. Efeito da ingestão de suco de laranja sanguínea Moro sobre o conteúdo e a fosforilação de proteínas da via de sinalização inflamatória.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Modulação da expressão de miRNA por flavonoides.....	33
Tabela 2. Caracterização das participantes no período basal do estudo.....	60
Tabela 3. Parâmetros de qualidade, fenólicos totais, ácidos orgânicos, fibra alimentar e capacidade antioxidante do suco pasteurizado de laranja sanguínea Moro.....	61
Tabela 4. Espectro de massas de flavonoides de suco de laranja sanguínea Moro, obtido por LC-ESI-MS/MS, modo negativo.....	62
Tabela 5. Espectro de massas de antocianinas do suco de laranja sanguínea Moro obtido por LC-ESI-MS/MS, modo positivo.....	63
Tabela 6. Conteúdo de flavonoides no suco de laranja sanguínea Moro.....	64
Tabela 7. Conteúdo de carotenoides no suco de laranja sanguínea Moro.....	64
Tabela 8. Estimativa da ingestão diária de calorias, macronutrientes, fibras alimentares e vitamina C das participantes, no período basal e 2 e 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL de suco de laranja sanguínea Moro.....	65
Tabela 9. Composição corporal e pressão arterial avaliados no período basal e 2 e 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL de suco de laranja sanguínea Moro.....	66
Tabela 10. Perfil metabólico plasmático e sérico, avaliado no período basal e 2 e 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL de suco de laranja sanguínea Moro.....	67
Tabela 11. Número de miRNA analisados e detectados nas amostras de plasma.....	73
Tabela 12. <i>Fold change</i> da expressão plasmática de miRNA que apresentaram significância 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro (n = 8).....	73
Tabela 13. <i>Fold change</i> da expressão dos miRNA plasmáticos 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro (n = 19).....	74
Tabela 14. Localização cromossômica do miRNA modulado no plasma após a ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro.....	74
Tabela 15. Número de miRNA analisados e detectados nas amostras de PBMC.....	76
Tabela 16. <i>Fold change</i> da expressão de miRNA em PBMC que apresentaram significância 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro (n = 8).....	76
Tabela 17. <i>Fold change</i> da expressão de miRNA em PBMC 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro (n = 20).....	77
Tabela 18. Localização cromossômica dos miRNA modulados em PBMC após a ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro.....	77

Tabela 19. Número de mRNA identificados na análise <i>in silico</i> como alvos experimentalmente validados, altamente preditos e moderadamente preditos.....	79
Tabela 20. Número de mRNA da via de sinalização inflamatória identificados na análise <i>in silico</i> como alvos experimentalmente validados, altamente preditos e moderadamente preditos.....	79
Tabela 21. Citocinas, moléculas de adesão e quimiocina avaliadas no período basal e 2 e 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL de suco de laranja sanguínea Moro.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGS	Ácidos graxos saturados
ALT	Alanina aminotransferase
AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
AOAH	Aciloxiacil hidrolase
AP-1	Proteína ativadora 1
ASK1	Quinase 1 reguladora de sinal de apoptose
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
Bcl-2	Regulador de apoptose Bcl-2
C3G	Cianidina-3-O-glicosídeo
C3PO	Componente 3 do promotor de RISC
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação ética
CCL	C-C <i>motif</i> ligante
CD14	<i>Cluster</i> de diferenciação 14
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CFS1	Fator estimulador da colônia de macrófagos
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COX-2	Ciclooxigenase 2
Cq	Ciclo de quantificação
CSF1	Fator estimulador de colônia 1
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CXCL	C-X-C <i>motif</i> ligante
DAD	Detector de arranjo de diodo
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>
DM2	Diabete melito tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão médio
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
GGT	Gama glutamil transferase

GPx2	Glutathiona peroxidase 2
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HOMA-IR	Modelo de avaliação da homeostase de resistência à insulina
HOXB1	<i>Homeobox B1</i>
ICAM-1	Molécula de adesão celular intracelular 1
IKK α	Quinase alfa inibidora do I κ B α
IKK β	Quinase beta inibidora do I κ B α
IKKy/NEMO	Quinase gama inibidora do I κ B α
IL	Interleucina
IL-1R	Receptor de interleucina 1
IMC	Índice de massa corporal
IRAK	Quinase associada ao receptor de interleucina 1
I κ B α	Inibidor alfa do fator nuclear kappa B
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
LBP	Proteína ligadora de lipopolissacarídeo
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
LC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas em tandem e ionização por electrospray
MAP3K8	Proteína quinase quinase quinase ativada por mitógeno 8
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1, também conhecida como CCL2
MD-2	Proteína de diferenciação mieloide
MEK	MAPK/ERK quinase
miRNA	microRNA
MKK	MAPK quinase
MnSOD	Manganês superóxido dismutase
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MyD88	Proteína de diferenciação mieloide 88
<i>NFKB1</i>	Fator nuclear kappa B subunidade p50
<i>NFKBIA</i>	Inibidor alfa do fator nuclear kappa B
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NRF2	<i>NF-E2-related factor 2</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORAC	Capacidade de absorção do radical oxigênio

p105	Fator nuclear Kappa B subunidade p105
p38	Proteína quinase ativada por mitógenos 14 (MAPK14)
p50	Fator nuclear Kappa B subunidade p50
p65	Fator nuclear Kappa B subunidade p65
PBMC	Célula mononuclear do sangue periférico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCA	Ácido protocatecuico
PCR	Proteína C reativa
PP2A	Proteína fosfatase 2A
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
pri-miRNA	microRNA primário
RA24h	Recordatório alimentar de 24 horas
RAN-GTP	Proteína nuclear RAN de ligação a guanosina trifosfato
RELA	Fator nuclear kappa B subunidade p65
RIP	Quinase de interação com receptor
RISC	Complexo RNA de indução de silenciamento
RNA	Ácido ribonucleico
RNA Pol II	RNA polimerase II
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase, quantitativa, em tempo real
SAA	Proteína sérica amiloide A
sCD14	<i>Cluster</i> de diferenciação 14 solúvel
sICAM-1	Molécula de adesão intercelular solúvel 1
SOCS	Supressor de sinalização de citocinas
STZ	Estreptozotocina
sVCAM-1	Molécula de adesão celular vascular solúvel 1
TAB	Proteína ligadora de TAK1
TAB	Proteínas de ligação a TAK1
TAK1	Fator de transformação de crescimento beta 1
TBST	Solução salina tamponada com Tris e suplementada com detergente Tween® a 0,1%
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Tet2	Metilcitosina dioxigenase 2
TIRAP	Proteína adaptadora contendo domínio TIR
TLR	Receptor do tipo <i>toll</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

TNFR1	Receptor de fator de necrose tumoral alfa
TNFRSF	Superfamília de receptores do TNF
TNFSF	Membro da superfamília do TNF
TRADD	Domínio de morte associado ao TNFR
TRAF	Fator associado ao receptor de TNF
TRAM	Proteína de membrana associada à translocação
TRBP	<i>TAR RNA-binding protein</i>
TRIF	Molécula adaptadora 1 de TLR
TSS	Teor de sólidos solúveis
UniSp	<i>Synthetic RNA spike-in</i>
UTN	<i>Universal trial number</i>
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
VCT	Valor calórico total
ZO-1	Zônula de oclusão 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIETA OCIDENTAL, EXCESSO DE PESO E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS

O processo de transição epidemiológica é caracterizado pelo aumento da prevalência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como diabetes melito tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares, doença hepática gordurosa não alcoólica e câncer. As DCNT representam problema de saúde pública relevante e estão associadas à transição alimentar e nutricional e à adoção de um estilo de vida sedentário (FOGLI-CAWLEY et al., 2007). Pesquisas populacionais mostram forte associação entre a dieta ocidental e a prevalência de DCNT (HEIDEMANN et al., 2008). Conforme já vem sendo evidenciado no Brasil (MONTEIRO et al., 2011), a dieta ocidental é atualmente caracterizada pela baixa ingestão de frutas e hortaliças e elevada ingestão de alimentos ricos em carboidratos de alto índice glicêmico, sódio, colesterol e ácidos graxos saturados (AGS) e trans (FUNG et al., 2001; CHRIST et al., 2019). Em 2019, apenas um em cada três adultos brasileiros relatavam consumir frutas e hortaliças, cinco ou mais dias por semana (BRASIL, 2020). Esses fatos indicam que grande parte da população brasileira apresenta ingestão inadequada de vitaminas, de minerais e de compostos bioativos.

O padrão dietético ocidental associado ao aumento da inatividade física — devido à natureza cada vez mais sedentária de muitas formas de trabalho — e da urbanização causam um desequilíbrio energético entre o valor calórico total (VCT) ingerido e o gasto energético total diário, resultando em um balanço energético positivo com consequente aumento da massa corporal, o que favorece o aumento da prevalência de excesso de peso na população (SMITH e SMITH, 2016). O excesso de peso e a obesidade são definidos como acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal com implicações à saúde. Atualmente, a classificação da massa corporal em adultos é comumente avaliada por meio do índice de massa corporal (IMC), obtido a partir da divisão do peso em quilos (kg) pela estatura em metros (m) ao quadrado. Para adultos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) define sobrepeso como IMC entre 25 kg/m² e 29,9 kg/m²; e a obesidade como IMC igual ou maior que 30 kg/m² (WHO, 1995).

A prevalência mundial do excesso de peso quase triplicou entre 1975 e 2016. Estima-se que em 2016, mais 2,2 bilhões de pessoas apresentavam excesso de peso, sendo 1,9 bilhão de adultos (39%), dos quais 650 milhões (16%) apresentavam obesidade. Entre crianças e adolescentes de 5 a 19 anos e crianças menores de 5 anos, 340 e 41 milhões apresentavam excesso de peso, respectivamente (WHO, 2021). No Brasil, a prevalência do excesso de peso aumentou 26% em dez anos, passando de 42,6% em 2006 para 53,8% em 2016, e a obesidade aumentou 60%, passando de 11,8% em 2006 para 18,9% em 2016 (BRASIL, 2017). Em 2019, o excesso de peso e a obesidade continuaram a aumentar, atingindo 55,4% e 20,3% da população brasileira, respectivamente (BRASIL, 2020). Cabe destacar que a obesidade é um dos principais problemas de saúde pública deste século, uma vez que o excesso de peso é um fator de risco importante para o desenvolvimento de DCNT, como o DM2 e as doenças cardiovasculares (ORTEGA et al., 2016).

1.2 INFLAMAÇÃO METABÓLICA

O padrão dietético ocidental favorece o aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade, acompanhados por distúrbios fisiológicos, como hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia e hipertensão arterial, as quais, por sua vez, provocam estresse oxidativo e aumento de mediadores pró-inflamatórios, condições que favorecem o desenvolvimento da resistência à ação da insulina e da disfunção endotelial (O'KEEFE et al., 2008). Essas alterações metabólicas causadas pelo excesso de peso, predispõe ao desenvolvimento da síndrome metabólica, definida como um conjunto de fatores fortemente relacionados, principalmente com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e DM2. Sabe-se que a dieta ocidental e o excesso de gordura corporal resultante são responsáveis por gerar uma inflamação crônica e de baixa intensidade, em que a ativação do sistema imune ocorre na ausência de infecção ou doença autoimune, afetando não apenas uma região ou tecido específico, mas diferentes sistemas fisiológicos (LI CHU et al., 2018).

No estudo da obesidade e suas possíveis repercussões metabólicas, é condição *sine qua non* a compreensão de que o sistema imune e diferentes vias metabólicas estão intimamente relacionados e funcionalmente dependentes. Nesse sentido, vias de sinalização

responsivas à ingestão de nutrientes e à presença de patógenos são evolutivamente conservadas e altamente integradas. A ingestão excessiva de nutrientes associada à obesidade pode ser detectada por receptores de reconhecimento de modelos inatos, o que culmina na ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias e respostas de estresse em diferentes locais do organismo, acarretando em uma inflamação crônica e de baixa intensidade, que é designada, segundo Hotamisligil (2006), como inflamação metabólica, a qual difere da resposta inflamatória clássica, bem como a sua gênese está intimamente associada ao estilo de vida, particularmente à qualidade da dieta e à prática de atividade física.

A ingestão excessiva de AGS, especialmente ácidos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) em dietas ocidentais, está relacionada ao desenvolvimento da inflamação metabólica no período pós-prandial (SEKAR et al., 2017). Nesse contexto, verifica-se que o aumento da ingestão de determinados AGS favorece o aumento da concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral (TNF)- α , a interleucina (IL)-1, IL-6, a molécula de adesão intercelular solúvel 1 (sICAM-1) e a molécula de adesão celular vascular solúvel 1 (sVCAM-1) (NAPPO et al., 2002). Além disso, o excesso de ingestão de AGS predispõe a alterações na composição da microbiota intestinal e aumento da permeabilidade intestinal, favorecendo o aumento da concentração plasmática de lipopolissacarídeos (LPS), cujo fenômeno é chamado de endotoxemia metabólica, o qual, em parte, também pode induzir um estado inflamatório crônico e de baixa intensidade e está relacionado ao desenvolvimento de DCNT (LAUGERETTE et al., 2011).

O LPS é uma endotoxina glicolipídica presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas, sendo composto por um polissacarídeo hidrofílico e um domínio hidrofóbico denominado lipídio A, que é responsável pela ativação da resposta inflamatória. Quando bactérias Gram-negativas se multiplicam ou morrem, o LPS é liberado como uma forma livre ou um complexo de LPS associado a proteínas de superfície bacteriana (HEUMANN e ROGER, 2002). Cabe destacar que dietas hiperlipídicas podem ocasionar endotoxemia metabólica, tanto em modelos animais quanto em humanos (GHANIM et al., 2010; LAUGERETTE et al., 2011). A ingestão excessiva de lipídios pode promover disbiose intestinal com aumento do número de bactérias Gram-negativas em relação às Gram-positivas no lúmen intestinal e, conseqüentemente, de LPS (CANI et al., 2007; DELZENNE;

CANI, 2011). Nesse contexto, o excesso de ingestão de lipídios pode induzir, por consequência, o aumento da absorção intestinal de LPS por meio da incorporação desta endotoxina em quilomícrons (GHOSHAL et al., 2009; CLEMENTE-POSTIGO et al., 2012). Além disso, é sugerido que o excesso de lipídios aumenta a permeabilidade intestinal, por meio da formação excessiva de quilomícrons nos enterócitos, os quais são secretados no espaço intercelular e devem atingir a lâmina própria e os vasos linfáticos antes de entrarem na circulação sistêmica. Nesse processo, o acúmulo de quilomícrons no espaço intercelular pode aumentar a pressão local e causar aumento da permeabilidade por meio de alterações nas junções oclusivas entre os enterócitos (MOREIRA et al., 2012). O excesso de lipídios na dieta pode ainda diminuir a atividade enzimática da fosfatase alcalina intestinal, responsável pela degradação de LPS (VÁZQUEZ et al., 2000; KAUR et al., 2007), e levar a diminuição da expressão gênica das proteínas ZO-1 (zônula de oclusão 1) e ocludina, comprometendo as junções oclusivas, conforme foi verificado em camundongos C57BL/6, alimentados com ração hiperlipídica, por quatro semanas (CANI et al., 2008). Esses fatos demonstram que a dieta rica em lipídios prejudica o microbioma intestinal e aumenta a permeabilidade intestinal, culminando no aumento da concentração plasmática de LPS.

Na corrente sanguínea, o LPS se liga principalmente a proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP), formando um complexo LPS-LBP capaz de interagir com o receptor de superfície celular, denominado *cluster* de diferenciação 14 (CD14), que é encontrado em monócitos, macrófagos e neutrófilos. A interação do complexo LPS-LBP com o CD14, permite a ligação desse complexo com o receptor do tipo *Toll* (TLR)-4, que está associado ao antígeno linfocitário 96, também conhecido como proteína de diferenciação mieloide (MD-2), que é necessário para a ativação da resposta celular ao LPS (TOBIAS et al., 1999; HEUMANN e ROGER, 2002). Algumas células não expressam o CD14, mas respondem ao complexo LPS-LBP na presença da forma plasmática solúvel do CD14 (sCD14). Entre essas células, incluem-se células endoteliais, epiteliais, dendríticas e do músculo liso e astrócitos (TOBIAS et al., 1999). A síntese hepática de LBP e sCD14 é aumentada durante o processo inflamatório associado à endotoxemia metabólica (GRUBE et al., 1994; BAS et al., 2004). Portanto, o desenvolvimento da inflamação metabólica é acompanhado por um aumento da concentração plasmática de LBP e de sCD14, uma vez que essas proteínas são essenciais para o reconhecimento imunológico do LPS (BOUTAGY et al., 2016).

Embora o complexo receptor contendo CD14, MD-2 e TLR4 seja necessário para a ativação da resposta celular ao LPS, apenas o TLR4 é capaz de transmitir o reconhecimento do ligante para o interior da célula, uma vez que o CD14 e o MD-2 são proteínas auxiliares que não possuem um domínio intracelular (TOBIAS et al., 1999; HEUMANN e ROGER, 2002). Por outro lado, o TLR4 faz parte de uma família de receptores transmembrana, os quais são expressos em muitos tipos celulares e reconhecem produtos de uma ampla variedade de microrganismos. Em humanos, já foram identificados 11 genes que codificam TLR (TLR 1 a 11) (KAWAI e AKIRA, 2010). Além do LPS, o TLR4 também pode ser ativado por proteínas endógenas, como o peptídeo beta amiloide (Abeta1-42) envolvido na fisiopatologia da doença de Alzheimer; além de derivados de lipídios como a LDL oxidada (oxLDL) e o 4-hidroxinonenal (HNE), que é derivado da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados ômega 6 (MANČEK-KEBER e JERALA, 2015).

O reconhecimento de ligantes pelo TLR4 acarreta o recrutamento de proteínas intracelulares adaptadoras, como a proteína de diferenciação mieloide 88 (MyD88), que provoca o recrutamento e a ativação de diversas proteínas quinases, como as quinases associadas ao receptor de interleucina 1 (IRAK) 1, -2 e -4. Após serem fosforiladas, a IRAK1 é dissociada do complexo receptor e associada à proteína denominada fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6), o que causa a ubiquitinação dessa proteína e a consequente ativação do fator de transformação de crescimento beta 1 (TAK1), responsável por ativar o complexo I κ B quinases (IKK). Esse complexo é composto de duas subunidades catalíticas, a quinase alfa inibidora do I κ B α (IKK α) e a quinase beta inibidora do I κ B α (IKK β), além de uma subunidade regulatória, a quinase gama inibidora do I κ B α (IKK γ /NEMO), que promove a fosforilação do inibidor alfa do fator nuclear kappa B (I κ B α). A fosforilação do I κ B α resulta na sua poliubiquitinação, a qual, por sua vez, acarreta na sua degradação mediada pelo proteassoma 26S, o que permite, desse modo, que o fator nuclear kappa B (NF- κ B) — dímero formado pelas subunidades p65 e p50 — transloque para o interior do núcleo celular (WATTERS et al., 2007; SUGANAMI e OGAWA, 2010).

A TAK1 também promove ativação da família de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), incluindo a p38 e a quinase c-Jun N-terminal (JNK), as quais são reguladas por diferentes MAPK quinase (MKK3, -4, -6 e -7) e estão intimamente ligadas à regulação da expressão de genes inflamatórios (GANTKE et al., 2012). JNK também pode ser

ativada por vias independentes do TLR4, como por meio do estresse do retículo endoplasmático causado pelo excesso de AGS (LANCASTER et al., 2018). Além disso, outra parte da via das MAPK é acionada por meio da ativação do complexo IKK, o qual fosforila a NF- κ B subunidade p105 (p105) e leva a liberação da proteína quinase quinase quinase ativada por mitógeno 8 (MAP3K8). Essa quinase é responsável por fosforilar diretamente a MAPK/ERK quinase 1 (MEK1), culminado na ativação das quinases reguladas por sinal extracelular (ERK). Desse modo, a ativação da via de sinalização das MAPK resulta na ativação e translocação do fator de transcrição designado proteína ativadora 1 (AP-1) para o núcleo (GANTKE et al., 2012; GAZON et al., 2017).

A translocação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 para o núcleo permite a transcrição de diversos genes, cujos produtos são importantes para o desenvolvimento da resposta inflamatória, como as citocinas dependentes do NF- κ B, incluindo o TNF- α , IL-1 e IL-6 (WATTERS et al., 2007; SUGANAMI e OGAWA, 2010). Além de outras moléculas, como os diferentes tipos de quimiocinas [C-C *motif* ligante (CCL) e C-X-C *motif* ligante (CXCL)], capazes de controlar a migração e a residência de células imunes; as moléculas de adesão celular vascular (VCAM-1) e intercelular (ICAM-1), responsáveis pela adesão e a facilitação da transmigração endotelial de leucócitos; o fator estimulador da colônia de macrófagos (CSF1); e a ciclooxigenase-2 (COX-2), enzima envolvida na síntese de prostaglandinas, as quais atuam na regulação da resposta inflamatória (ZHOU et al., 2020) (Figura 1).

O TNF- α , IL-1 e IL-6 atuam como mediadores inflamatórios por meio de interações mediadas por receptores com diversas células alvo (WOJDASIEWICZ et al., 2014), induzindo, por exemplo, o aumento da expressão do supressor de sinalização de citocinas (SOCS)-3 após a ingestão de uma dieta hiperlipídica no período pós-prandial (GHANIM et al., 2009). O SOCS-3 pode atenuar a sinalização da insulina se ligando ao receptor de insulina e reduzindo a sua capacidade de fosforilar o substrato do receptor de insulina (IRS)-1 (UEKI et al., 2004), além de favorecer o ganho de peso corporal por meio da indução de resistência à ação da leptina (BJØRBAEK et al., 1999). O TNF- α pode também ativar as proteínas da família da MAPK responsáveis pela ativação do fator de transcrição AP-1, favorecendo o aumento da resposta inflamatória (SUGANAMI e OGAWA, 2010). No fígado, tecido adiposo e músculo esquelético, o TNF- α prejudica a sinalização da insulina (MONROY et al., 2009) devido à ativação de serina-quinases como a JNK e o IKK, que causam a fosforilação do resíduo de

serina do IRS-1, diminuindo a capacidade de fosforilação em resíduos de tirosina do IRS-1 após estímulo com insulina (HOTAMISLIGIL et al., 1996). Em hepatócitos e miócitos, o TNF- α também pode inibir a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) e, conseqüentemente, reduzir a oxidação dos ácidos graxos (STEINBERG et al., 2006).

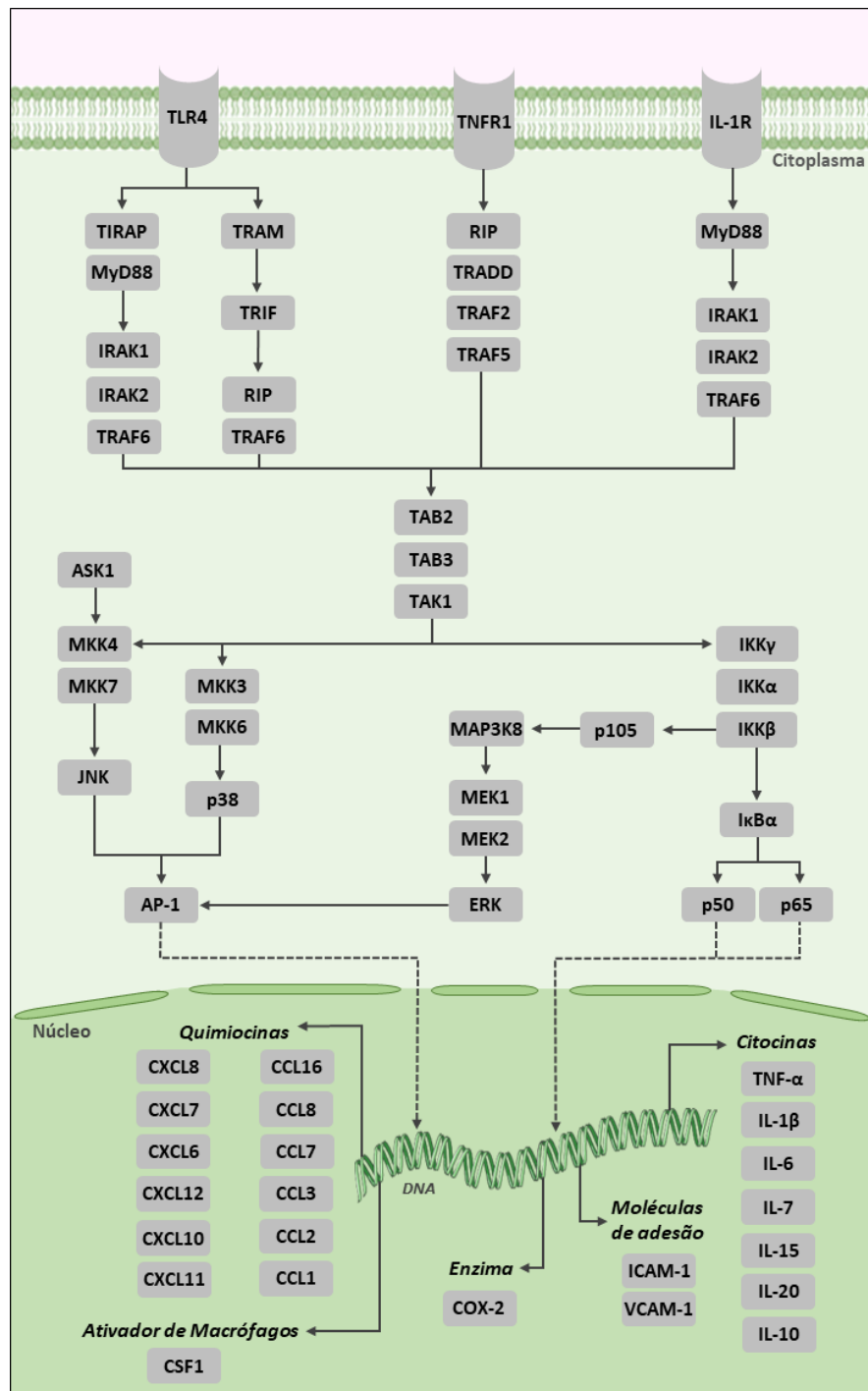


Figura 1. Ativação das vias de sinalização MAPK e NF- κ B por TLR4, TNFR1 e IL-1R. Descrição no texto. Abreviações: ver lista de abreviaturas e siglas.

Em resposta às citocinas pró-inflamatórias liberadas em indivíduos com inflamação metabólica, o fígado sintetiza uma série de proteínas de fase aguda positiva, as quais podem intensificar a inflamação. No desenvolvimento desse processo, as proteínas LBP e sCD14 têm sua síntese hepática aumentada por IL-6 (GRUBE et al., 1994; BAS et al., 2004). A proteína sérica amiloide A (SAA), que é sintetizada predominantemente no fígado, tem sua síntese aumentada em resposta ao TNF- α , IL-1, IL-6 (SANDRI et al., 2008; YE e SUN, 2015) e LPS (MIGITA et al., 2004). A SAA é capaz de se ligar ao TLR4 e aumentar a resposta inflamatória (SANDRI et al., 2008; YE e SUN, 2015). A IL-6 e IL-1 β também estimulam a síntese hepática da proteína C reativa (PCR), um biomarcador inflamatório importante que opsoniza bactérias e células apoptóticas, facilitando sua depuração via sistema complemento e fagócitos (RHODES et al., 2011). Entretanto, no desenvolvimento da inflamação metabólica, em que a ativação do sistema imune ocorre na ausência de infecção induzida por microrganismos (HOTAMISLIGIL, 2006; LI CHU et al., 2018), o aumento da concentração plasmática de PCR está associada ao desenvolvimento de resistência à ação da insulina e doenças cardiovasculares (DEVARAJ et al., 2009). Além da PCR, a IL-6 ainda estimula a síntese de fibrinogênio, uma glicoproteína necessária para o processo de coagulação sanguínea. O aumento do fibrinogênio plasmático é considerado um biomarcador do estado inflamatório e de alto risco para o desenvolvimento de doenças inflamatórias vasculares, como a hipertensão e a aterosclerose (PARASKEVAS et al., 2008). O fibrinogênio também é capaz de se ligar ao TLR4 estimulando a liberação de várias quimiocinas e citocinas, como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), IL-6 e TNF- α (SMILEY et al., 2001; HODGKINSON et al., 2008).

Os produtos da degradação do fibrinogênio também podem favorecer o processo inflamatório. A conversão do fibrinogênio pela ação da trombina gera fibrina, a qual atua na formação do coágulo sanguíneo. A concentração elevada de produtos de degradação da fibrina, como D-dímero, é amplamente utilizada na prática clínica como indicador de inflamação, do aumento da atividade de coagulação e como preditor do risco para eventos trombóticos (LOWE, 2005). Além disso, os peptídeos liberados como parte da formação de fibrina como o fibrinopeptídeo B, que é clivado do fibrinogênio pela trombina, podem atuar como quimioatrativos para os leucócitos e, desse modo, modular de forma independente a resposta inflamatória (SKOGEN et al., 1988).

Desse modo, o padrão alimentar ocidental está associado à obesidade e à inflamação metabólica, condições que favorecem o desenvolvimento da resistência à ação da insulina, que se caracteriza como um dos principais componentes da síndrome metabólica (ZHONG et al., 2017; NAMAZI et al., 2018). De acordo com os critérios brasileiros, a síndrome metabólica ocorre quando estão presentes três dos seguintes critérios: (a) obesidade central com circunferência da cintura superior a 88 cm na mulher e 102 cm no homem; (b) intolerância à glicose com glicemia de jejum maior ou igual a 110 mg/dL; (c) terapia anti-hipertensiva vigente ou pressão arterial sistólica maior ou igual a 130 mmHg e/ou diastólica maior ou igual a 85 mmHg; (d) triacilglicerol maior ou igual a 150 mg/dL; e (e) HDL-colesterol maior que 40 mg/dL em homens e 50 mg/dL em mulheres (VOLP et al., 2008).

O efeito da mudança de hábitos alimentares sobre a inflamação metabólica, especialmente como a maior ingestão de frutas, pode ser um dos mecanismos protetores em relação a esses distúrbios metabólicos (ZHONG et al., 2017; NAMAZI et al., 2018). Neste contexto, um efeito benéfico da ingestão de frutas e hortaliças, principalmente das frutas, é relatado em relação ao estresse oxidativo (COCATE et al., 2014; CROWE-WHITE et al., 2017), inflamação (HOLT et al., 2009; SILVEIRA et al., 2018), doenças cardiovasculares (ALAM et al., 2013) e DM2 (PU et al., 2012). Na inflamação, é mostrado que uma alta ingestão de frutas e hortaliças reduz as concentrações de IL-6, TNF- α e PCR e está associada a maior capacidade antioxidante do plasma (HOLT et al., 2009). Esses efeitos são principalmente atribuídos aos componentes nutricionais encontrados nesses alimentos, sobretudo o conteúdo de vitamina C, fibras (HERMSDORFF et al., 2012) e flavonoides (TRIPOLI et al., 2007).

1.3 EPIGENÔMICA NUTRICIONAL

A subdisciplina da Genômica Nutricional que estuda a influência da alimentação sobre o epigenoma pode ser chamada de Epigenômica Nutricional ou Nutriepigenética. O termo epigenética diz respeito a uma subárea da biologia molecular que estuda a interação entre genes e seus produtos. “Epi” significa acima ou além e “genética” é a ciência que estuda os genes e a hereditariedade. De maneira simplificada, a epigenética pode ser descrita como mudanças hereditárias na expressão gênica, independentes de alterações na sequência de nucleotídeos no DNA. Os principais mecanismos epigenéticos conhecidos

incluem a metilação do DNA, as modificações pós-transcricionais (acetilação, metilação, fosforilação, entre outras) em proteínas histonas e a atividade de RNA não-codificantes, em especial os microRNA (miRNA) (COMINETTI et al., 2017).

Os miRNA são pequenos ácidos ribonucleicos (RNA) não codificadores de proteínas, que se destacam pela regulação da expressão gênica em nível pós-transcricional, sendo um possível biomarcador para o diagnóstico e prognóstico de doenças (BARTEL, 2004; EL-MOGY et al., 2018). O primeiro miRNA foi descoberto em 1993, em um estudo que verificou a ação regulatória do miRNA *lin-4* sobre a expressão gênica de nematoides da espécie *Caenorhabditis elegans* (LEE et al., 1993). Após sua descoberta, outros miRNA foram identificados e, em pouco tempo, se mostraram como uma classe de pequenas moléculas de RNA que regulam a etapa de tradução da síntese proteica. Cabe destacar que mais de 60% da expressão gênica em humanos é regulada por miRNA (FRIEDMAN et al., 2008) envolvidos em diversos processos fisiológicos, como o ciclo celular (CHEN et al., 2010), a diferenciação celular (SHIVDASANI, 2006) e a apoptose (LIMA et al., 2011). Da mesma forma, os miRNA estão envolvidos em diferentes processos fisiopatológicos, incluindo inflamação (TAHAMTAN et al., 2018), doenças cardiovasculares (ZHOU et al., 2018), DM2 (OZDEMIR e FEINBERG, 2018) e câncer (HOSSEINAHLI et al., 2018).

Os miRNA são moléculas de RNA fita simples (18-25 nucleotídeos) (BARTEL, 2004), que, por meio da via canônica de biogênese, são originalmente transcritas a partir de uma região do gene — íntron ou éxon — pela RNA polimerase II (RNA Pol II), resultando em um miRNA primário (pri-miRNA). Ainda no núcleo, o pri-miRNA é clivado por um microprocessador formado pela enzima Drosha (RNase III) e seu cofator essencial DGCR8 (do inglês, *DiGeorge syndrome critical region 8*), dando origem a um pequeno RNA em forma de grampo com aproximadamente 65 nucleotídeos (pré-miRNA). O pré-miRNA forma um complexo com a proteína nuclear RAN de ligação a guanosina trifosfato (RAN-GTP) e a proteína exportina 5, o que permite sua translocação para o citoplasma através de poros nucleares (BARTEL, 2004; HA e KIM, 2014). No citoplasma, o GTP é hidrolisado, resultando na liberação e posterior clivagem do pré-miRNA pela Dicer (RNase III) em duas fitas de RNA pareadas (duplex de miRNA) contendo, aproximadamente, 22 nucleotídeos cada (OKADA et al., 2009).

Ainda no citoplasma, a Dicer — carreando o duplex de miRNA — e a proteína Argonauta 2 são recrutadas pela proteína TRBP (do inglês, *TAR RNA-Binding Protein*) com o auxílio de uma RNA helicase (DHX9), formando um complexo de silenciamento induzido por RNA (complexo RISC), o qual permite a transferência do duplex de miRNA para a Argonauta 2, onde o duplex de miRNA será separado em uma fita guia com menor estabilidade termodinâmica na região 5' (miRNA maduro, isoforma “5p”) e uma fita passageira que será dissociada da Argonauta 2 pela endonuclease C3PO e liberada para degradação (YE et al., 2011). Entretanto, a fita passageira também pode ser selecionada como fita guia e originar um miRNA maduro (isoforma “3p”) (BARTEL, 2004; HA e KIM, 2014).

Outras vias alternativas ou não canônicas podem gerar miRNA maduros independente do processamento por Drosha ou Dicer. Os miRNA denominados miRtrons, são sintetizados a partir da formação direta do pré-miRNA após *splicing* realizado por spliceossomos de mRNA transcritos de forma independente de Drosha na região de um íntron. Estima-se que 50% dos miRNA do genoma humano estão localizados em regiões intrônicas e, geralmente, são transcritos pelos mesmos promotores da unidade transcricional do gene no qual a região intrônica se situa. Há também miRNA que não dependem do processamento enzimático pela Dicer, uma vez que dependem da atividade catalítica da Argonauta 2 (HA e KIM, 2014). Apesar dessas vias alternativas para a síntese de miRNA, a maioria dessas moléculas é sintetizada pela via canônica e dependem do processamento por Drosha e Dicer (KIM et al., 2016).

Para exercer sua função, o miRNA maduro associado à Argonauta 2, dirige-se ao mRNA alvo visando o pareamento parcial ou completo entre o miRNA e mRNA alvo. Esse pareamento ocorre entre as bases nitrogenadas da região *seed*, constituída por 2 a 8 nucleotídeos na região 5' do miRNA, que inicia o pareamento do miRNA com a região 3' não traduzida (3'UTR) de um mRNA alvo. Desse modo, o miRNA pode regular a etapa de síntese proteica por meio da supressão da tradução ou degradação do mRNA alvo, via bloqueio da tradução após pareamento, degradação do mRNA pela argonauta 2, desestabilização do mRNA por remoção da cauda poli-A (deadenilação) e recrutamento de cofatores que auxiliam no bloqueio da tradução (AMERES e ZAMORE, 2013). Aliado a esses fatos, verifica-se que a expressão de miRNA pode ser controlada por fatores de transcrição associados à RNA Pol II, pela regulação da atividade da Drosha e DGCR8 e por mecanismos

epigenéticos, como a metilação do DNA e as modificações de histonas, que também contribuem para a regulação da expressão dessas moléculas (HA e KIM, 2014) (Figura 2).

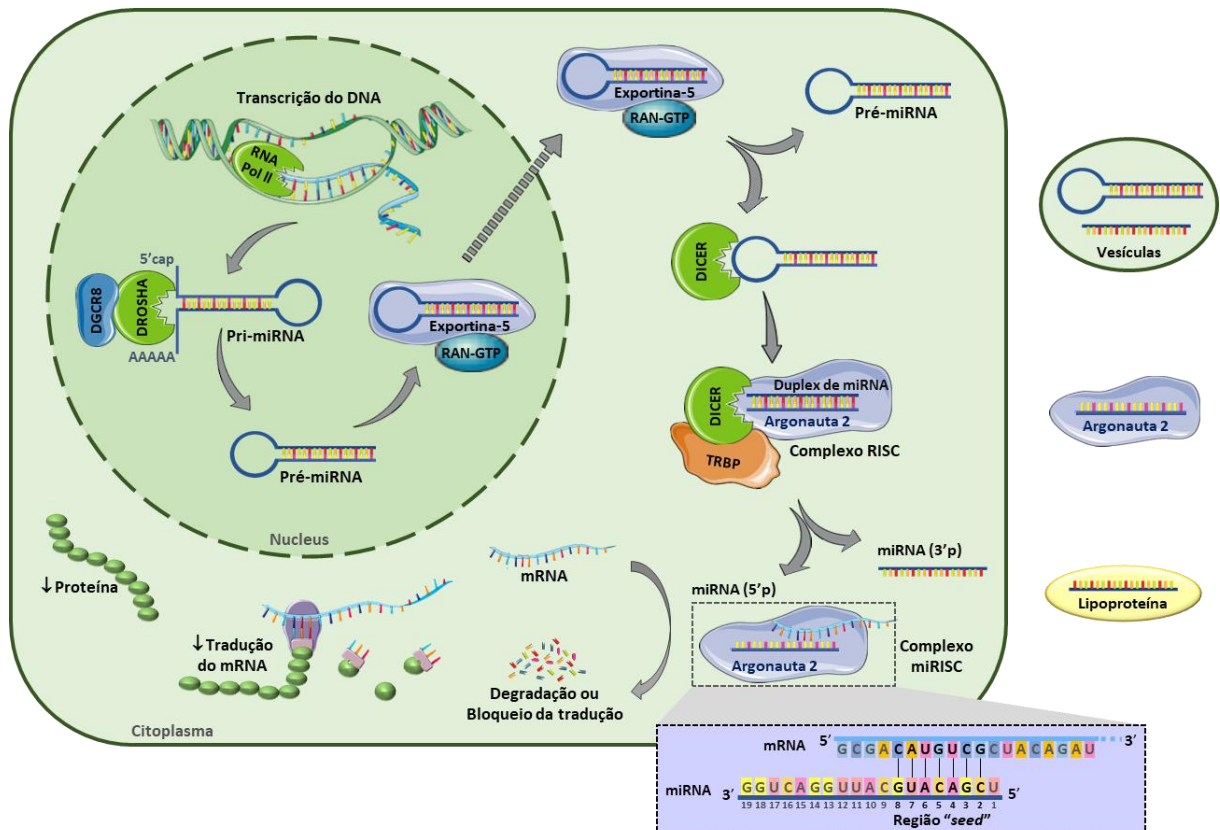


Figura 2. Biogênese, mecanismo de ação e secreção dos microRNA. Descrição no texto. Abreviações: ver lista de abreviaturas e siglas.

Os miRNA ou pré-miRNA também podem ser liberados para o meio extracelular associados, principalmente, com vesículas extracelulares. Em geral, as vesículas chamadas exossomos apresentam tamanho inferior a 200 nanômetros e são liberadas por exocitose quando corpos multivesiculares se fundem com a membrana plasmática, enquanto as vesículas designadas microvesículas apresentam tamanho superior a 200 nanômetros e se desprendem diretamente da membrana celular para o meio extracelular. Ademais, os miRNA extracelulares podem ser encontrados associados com a proteína Argonata 2 e lipoproteínas de alta densidade (HDL) e de baixa densidade (LDL). Essas estruturas protegem os miRNA da degradação e preservam sua estabilidade. É sugerido que a liberação extracelular de miRNA por essas vias possa atuar na comunicação intercelular (ZHANG et al.,

2015; MORI et al., 2019). Dessa forma, miRNA extracelulares podem ser encontrados no plasma, soro, urina, lágrima, saliva, leite materno, líquido amniótico, fluido seminal e colostro. A presença de miRNA em diferentes fluidos biológicos permite o desenvolvimento de estudos que procuram utilizar os miRNA como potenciais biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico de DCNT (EL-MOGY et al., 2018).

No contexto da obesidade, verifica-se que a hipertrofia e a hiperplasia do tecido adiposo são associadas com anormalidades intracelulares relacionadas à função dos adipócitos, as quais podem ser induzidas por alterações no perfil de expressão de miRNA. Neste sentido, constata-se que os miR-130b e miR-210 apresentam expressão reduzida durante a diferenciação de adipócitos em indivíduos magros e obesos, enquanto os miR-100, miR-125b, miR-221 e miR-222 tem aumento da expressão em indivíduos obesos e redução da expressão em indivíduos magros (ORTEGA et al., 2010). Por outro lado, os miR-103, miR-107, miR-143 e miR-185 são induzidos em adipócitos de indivíduos magros, porém, apresentam redução da expressão em indivíduos obesos. O miR-34a apresenta maior expressão durante a adipogênese, sendo esta expressão positivamente associada ao IMC. No tocante à regulação da resposta inflamatória, verifica-se que o TNF- α induz a redução da expressão do miR-103 e do miR-143, o que prejudica a formação de adipócitos metabolicamente ativos e completamente diferenciados (XIE et al., 2009).

Cabe destacar que os mecanismos epigenéticos podem ser influenciados pelo padrão alimentar (REMELY et al., 2015; QUINTANILHA et al., 2017; QUINTANILHA et al., 2020). Nesse sentido, foi evidenciado que a elevada ingestão de alimentos fontes de AGS — cujo fato compõe parte do padrão de dieta ocidental —, além de favorecer a obesidade e a inflamação metabólica (ZHONG et al., 2017; NAMAZI et al., 2018), influencia a expressão de miRNA envolvidos com o desenvolvimento de DCNT. Zhu Hon et al. (2011) mostraram que uma ração com 20% do VCT na forma de lipídios em relação a uma dieta com 5% de lipídios foi capaz de reduzir a expressão do miR-143 e do miR-145, cujo fato aumentou a expressão de genes envolvidos com o desenvolvimento do câncer de cólon em camundongos.

Dentre os estudos que avaliaram a influência do padrão dietético sobre a expressão de miRNA em humanos, Desgagné et al. (2016) verificaram que a ingestão de dietas ricas em ácido graxo trans, de origem industrial e ruminante, em homens adultos (IMC de 25 kg/m²), por quatro semanas, aumentou a expressão do miR-135a-3p e do miR-223-3p presentes na

HDL. A alteração na expressão do miR-135a-3p foi associada ao aumento das concentrações plasmática de LDL e triacilglicerois, enquanto o aumento da expressão do miR-223-3p foi associada à redução da concentração plasmática de HDL e aumento da concentração plasmática de PCR.

Embora o padrão dietético ocidental influencie a expressão de genes que podem ocasionar desordens metabólicas, favorecendo o desenvolvimento de DCNT (ROSS e DAVIS, 2014; ROME, 2015; GAVRILAS et al., 2016; SLATTERY et al., 2016; GILLAND e FOX, 2017), a ingestão de uma dieta saudável, com adequada ingestão de frutas e hortaliças, é essencial para a redução do risco de DCNT (SLAVIN e LLOYD, 2012; KONSTANTINIDOU et al., 2014; KIMOKOTI e MILLEN, 2016). Nesse sentido, cabe destacar que a OMS recomenda uma ingestão diária de, pelo menos, 400 g de frutas e hortaliças (WHO, 2003). Entretanto, apesar do Brasil ser o terceiro maior produtor de frutas do mundo (IBGE, 2021), o consumo de frutas e hortaliças pela população está abaixo do recomendado (BRASIL, 2020). As frutas são ricas em fibras alimentares, minerais, vitaminas e diversos fitoquímicos, incluindo carotenoides e compostos fenólicos como os flavonoides, que, em estudos *in vitro*, clínicos e epidemiológicos, foram relacionados às atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica, indicando potencial papel benéfico na redução do risco de DCNT (BURTON-FREEMAN, 2010; SLAVIN e LLOYD, 2012; MILENKOVIC et al., 2013; GONZÁLEZ et al., 2014).

Vitaminas, minerais e fitoquímicos podem modular a expressão de miRNA e, conseqüentemente, afetar a expressão de genes que regulam, por exemplo, a resposta inflamatória (MILENKOVIC et al., 2013; BECKETT et al., 2014; QUINTANILHA et al., 2017). Kim et al. (2015) demonstraram que, após oito semanas de suplementação com 1250 mg/dia de vitamina C, homens, não-fumantes e fumantes, apresentaram mais de 90% de redução na expressão de miR-155 em HDL. A expressão do miR-155 é associada à modulação da resposta pró-inflamatória, uma vez que é induzida por LPS e estresse oxidativo em macrófagos. Segundo os autores, a vitamina C pode melhorar a atividade anti-inflamatória via diminuição do miR-155.

Dentre os estudos com flavonoides, em macrófagos RAW 264.7, a quercetina, um flavonoide também encontrado na uva e, o seu metabolito, isoramnetina, atenuaram o aumento da expressão de miR-155 induzido por LPS (BOESCH-SAADATMANDI et al., 2011).

Em camundongos que não expressam o gene que codifica a apolipoproteína E, foi demonstrado que, após duas semanas de ingestão de uma ração suplementada com os flavonoides cítricos hesperidina e naringina a 0,006% (correspondendo a um consumo equivalente em humanos de 30 mg/dia), verificou-se modulação induzida pela hesperidina e naringina da expressão de 97 e 69 miRNA hepáticos, respectivamente. A suplementação com hesperidina e naringina aumentou a expressão de 44 e 36 miRNA, respectivamente, e diminui a expressão de 53 e 33 miRNA, respectivamente (MILENKOVIC et al., 2012). Nessa perspectiva, novas descobertas vêm sendo relatadas nos últimos anos, e estudos promissores, *in vivo* e *in vitro*, demonstram o efeito dos flavonoides sobre a expressão dos miRNA. Esses trabalhos evidenciam que os miRNA podem ser potenciais alvos dos flavonoides (MILENKOVIC et al., 2013) (Tabela 1).

Tabela 1. Modulação da expressão de miRNA por flavonoides.

Composto	Tratamento	Modelo	miRNA	Alvos	Referência
Quercetina	2 mg/g/dia por 6 semanas	Células hepáticas de camundongo C57BL/6 tratados com quercetina.	↑ miR-125b ↑ miR-122	TNF- α AOAH	(BOESCH-SAADATMANDI et al., 2012)
Hesperidina	100 mg/kg/dia por 7 dias	Camundongos ICR tratados com LPS e hesperidina.	↑ miR-132	IL-1 β , IL-6 e TNF- α	(LI et al., 2016)
Genisteína	1000 nM por 6 horas	Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) tratadas com oxLDL (50 mg/L) por mais 24 horas.	↓ miR-155	SOCS1	(ZHANG et al., 2017)
EGCG	100 μ M por 24 horas	Células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2).	↑ miR-16	Bcl-2	(TSANG e KWOK, 2010)
Naringina	0,1 e 10 μ M por 48 horas	Células-tronco derivadas do estroma da medula óssea de coelho.	↑ miR-20a	PPAR γ	(FAN et al., 2015)

continua

Tabela 1 - Modulação da expressão de miRNA por flavonoides.

continuação

Composto	Tratamento	Modelo	miRNA	Alvos	Referência
Naringenina	10 e 100 µg/mL por 24 horas	Células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco2).	↓ miR-17-3p	MnSOD e GPx2	(CURTI et al., 2017)
C3G	100 µM por 24 horas	Células epiteliais da córnea humana (HCEC) tratadas com LPS (10 µg/ml) por 24 horas.	↑ let-7b-5p	HMGA2	(Li et al., 2020)

Abreviações: EGCG, epigallocatequina galato; C3G, cianidina-3-O-glicosídeo; LPS, lipopolissacarídeo; oxLDL, lipoproteína de baixa densidade oxidada; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; AOA, aciloxiacil hidrolase; IL, interleucina; SOCS1, supressor de sinalização de citocinas 1; Bcl-2, regulador de apoptose Bcl-2; PPAR γ , receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama; MnSOD, manganês superóxido dismutase; GPx2, glutatona peroxidase 2; HMGA2, do inglês, *high-mobility group AT-hook 2*. Seta para cima, aumento da expressão; Seta para baixo, diminuição da expressão.

1.4 LARANJA SANGUÍNEA MORO

Frutas cítricas são fontes consideráveis de nutrientes e compostos bioativos (MARTIN e APPEL, 2009). Dentre as variedades conhecidas, a laranja (*Citrus sinensis*) é a fruta mais produzida em volume e a segunda fruta mais consumida no Brasil (IBGE, 2021), perdendo apenas para a banana que se destaca como a fruta mais produzida e consumida no mundo (FAO, 2020). Em 2017, a produção de laranja no Brasil se destacou em relação à comercialização das demais frutas, contribuindo com um faturamento de 8,5 bilhões de reais à economia nacional, uma alta de 2% quando comparada ao ano anterior. A maior parte da produção de laranja é transformada em suco para exportação (IBGE, 2018), atendendo ao aumento da demanda pelo consumo de suco de fruta natural (CARMO et al., 2014; HYSON, 2015). Em 2019, o faturamento com as exportações de suco de laranja foi de 1,9 bilhão de dólares (VIDAL, 2019). Mas, para além do potencial econômico, a laranja apresenta considerável potencial nutricional, contendo concentrações significativas de fibras, vitamina C, flavonoides e carotenoides (TRIPOLI et al., 2007).

A laranja sanguínea ou vermelha (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) é pouco produzida no Brasil (LATADO et al., 2008). Os três tipos mais encontrados dessa laranja são Tarocco, Moro

(ambas nativas da Itália) e Sanguinello (nativa da Espanha) (BUTELLI et al., 2012; GROSSO et al., 2013). A laranja sanguínea apresenta alta concentração de vitamina C e flavonoides, chegando a 66 mg/100 g e 241 mg/100 g, respectivamente (CEBADERA-MIRANDA et al., 2019). A polpa escura com coloração avermelhada é devido à presença de antocianinas e carotenoides. Embora incomum em Citrus, as antocianinas são um pigmento comum em muitas flores e frutos. Apesar da polpa com coloração avermelhada, os tipos Cara Cara Navels e Vaniglia Sanguignos possuem essa coloração devido à presença de carotenoides (licopeno) e não de antocianinas como em laranjas sanguíneas (BUTELLI et al., 2012; GROSSO et al., 2013).

As flavanonas hesperidina e naringina são os principais flavonoides encontrados em cítricos e apresentam atividade antioxidante e anti-inflamatória tanto *in vitro* quanto *in vivo* (TRIPOLI et al., 2007). Diferentes estudos com flavonoides cítricos têm relatado os efeitos benéficos desses compostos em modelo animal e humano. Ratos *Wistar* com DM1 induzido por estreptozotocina (STZ), que foram suplementados com 10 g/kg/dia de hesperidina, por quatro semanas, quando comparados ao grupo controle, apresentaram aumento da insulinemia, da adiponectina e da atividade da enzima glicoquinase. Além disso, a hesperidina também foi associada à diminuição da glicemia, do colesterol total, de triacilglicerois, da LDL-colesterol, da VLDL-colesterol e da atividade da enzima glicose-6-fosfatase (AKIYAMA et al., 2009). Já em humanos que receberam uma dose 500 mg/dia de hesperidina, por três semanas, foi observado um efeito anti-inflamatório devido à redução das concentrações de PCR, SAA e E-selectina solúvel (RIZZA et al., 2011). Em indivíduos com sobrepeso, a suplementação com 292 mg/dia de hesperidina, por quatro semanas, diminui a pressão arterial diastólica (MORAND et al., 2011). Além disso, o consumo regular de suco de laranja ou bebida isocalórica contendo hesperidina isolada (500 mL/dia), por 4 semanas, modulou a expressão gênica de leucócitos em homens saudáveis com excesso de peso. Muitos desses genes estão associados à resposta inflamatória – por exemplo, diminuição da expressão de MCP-1 e CXCL2 – e ao metabolismo lipídico – por exemplo, aumento da expressão de transportadores ABC (ABC do inglês, *adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette*) (MILENKOVIC et al., 2011).

As antocianinas fazem parte de um grupo de flavonoides conhecidos como antocianidinas, que, estruturalmente, se diferenciam apenas em relação a dois radicais. As

antocianidinas mais comuns são pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina. Essas antocianidinas estão invariavelmente conjugadas a açúcares (glicosídeos) no vegetais, sendo chamadas de antocianinas (WALLACE e GIUSTI, 2015; KHOO et al., 2017). Esses compostos são produzidos e acumulados em diferentes órgãos de plantas (principalmente nas flores, frutas e folhas), em resposta a fatores genéticos e ambientais (por exemplo, temperatura), sendo responsáveis pela coloração de muitos vegetais e também por protegê-los de agressores ambientais (LANDI et al., 2015). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram ampla variedade de efeitos biológicas exercidos pelas antocianinas (KHOO et al., 2017), incluindo atividade antioxidante (QIAN et al., 2017) e anti-inflamatória (VENDRAME e KLIMIS-ZACAS, 2015), aumento da secreção de insulina (SUANTAWEE et al., 2017) e melhora da resistência à ação da insulina (TAKIKAWA et al., 2010) e do metabolismo lipídico (WANG et al., 2012).

A cianidina-3-O-glicosídeo (C3G) representa a antocianina em maior concentração em laranjas sanguíneas (KAFKAS et al., 2009). Em comparação com outras variedades de laranja sanguínea, a laranja sanguínea Moro, geralmente, tem concentração mais elevada de C3G e, por consequência, apresenta uma coloração mais intensa (BUTELLI et al., 2012; GROSSO et al., 2013). Diversos benefícios à saúde são atribuídos a C3G (OLIVAS-AGUIRRE et al., 2016), como a atenuação da resposta inflamatória induzida por LPS em fibroblastos humanos (SUN e LI, 2018) e o controle da massa corporal e melhora da tolerância à glicose, do perfil lipídico e das funções cardíacas e hepáticas em camundongos (BHASWANT et al., 2015). Além disso, o ácido protocatecuico (PCA), um metabólito intestinal da C3G, apresentou efeito antiaterogênico, diminuindo a expressão do miR-10b, o que favoreceu o aumento da expressão de ABCA1 (do inglês, *ATP binding cassette sub-family A member 1*) e ABCG1 (do inglês, *ATP-binding cassette sub-family G member 1*), possibilitando maior efluxo de colesterol a partir de macrófagos (WANG et al., 2012).

Os carotenoides são um grupo importante de pigmentos naturais lipossolúveis, compreendendo mais de 600 compostos, divididos em três classes de xantofilas (por exemplo: violaxantina, luteoxantina, luteína, mutatoxantina, zeaxantina, criptoxantina e anteraxantina), carotenos (por exemplo, α -caroteno e β -caroteno) e licopeno. Embora sejam amplamente difundidos na natureza, sendo sintetizados em vegetais, fungos e bactérias, apenas cerca de 40 carotenoides estão usualmente presentes na dieta humana, dos quais 20

foram encontrados em tecidos e fluidos biológicos (MILANI et al., 2017). A biodisponibilidade dos carotenoides é favorecida quando associada à ingestão de lipídios devido à característica lipossolúvel desses compostos. Entre os carotenoides, o β -caroteno tem o maior potencial pró-vitamina A (QIAN et al., 2012).

In vitro foi relatado que derivados de carotenoides podem se ligar à IKK β , o que acarreta em redução da fosforilação da I κ B α e, conseqüentemente, em diminuição da dissociação deste inibidor do complexo NF- κ B, ao mesmo tempo em que carotenoides também são capazes de se ligar a subunidade p65, o que atenua a translocação do NF- κ B para o núcleo celular (LINNEWIEL-HERMONI et al., 2014). Da forma semelhante, a luteína pode se ligar ao fator de transcrição denominado NRF2 (do inglês, *NF-E2-related factor 2*), o que promove a sua translocação para o núcleo e a ativação da expressão gênica de proteínas antioxidantes (FREDE et al., 2017). Estudos epidemiológicos mostraram uma melhora da atividade antioxidante e uma correlação entre alta ingestão de carotenoides na dieta e menor risco de ocorrência de degeneração macular, de doenças cardiovasculares e de câncer de mama, cervical, de ovário, colorretal e de próstata (TAPIERO et al., 2004; MILANI et al., 2017).

Por outro lado, os estudos em animais e humanos com a ingestão do suco de laranja sanguínea sugerem que os efeitos observados não podem ser explicados apenas pelo conteúdo de fitoquímicos, mas pelo sinergismo entre todos os componentes nutricionais (TITTA et al., 2010; SALAMONE et al., 2012; CARDILE et al., 2015; AZZINI et al., 2017). Entre os micronutrientes presentes nos cítricos sobressai o conteúdo de vitamina C, um importante antioxidante intracelular, que desempenha diversas funções no organismo, sobretudo, na síntese de colágeno, catecolaminas e carnitina, na melhora da função imune e no aumento da absorção intestinal de ferro não heme (OUDEMANS-VAN STRAATEN et al., 2014). A vitamina C mostrou-se potente em diminuir a ativação da via de sinalização do NF- κ B induzida por TNF- α , por meio da inibição da fosforilação de I κ B α (CÁRCAMO et al., 2002). Esse micronutriente também desempenha importante função na regulação da expressão gênica, induzindo a desmetilação do DNA por meio da ativação de metilcitosina dioxigenases (Tet) (LINDSEY et al., 2019).

A ingestão de sucos de fruta natural e integral, sem adição de açúcar ou adoçante, retêm a maioria dos nutrientes e compostos bioativos da fruta *in natura*, e pode contribuir

com a manutenção da saúde (HYSON, 2015). A ingestão de sucos de fruta integral associada a uma refeição pró-inflamatória está entre as estratégias nutricionais indicadas por alguns estudos que avaliam o efeito pró-inflamatório de uma dieta hiperlipídica, sugerindo um efeito protetor dos compostos fenólicos e dos nutrientes presentes nas frutas sobre a resposta inflamatória gerada no período pós-prandial (BURTON-FREEMAN, 2010). Em humanos, a ingestão de suco de laranja integral comercial atenuou o estresse oxidativo e o efeito pró-inflamatório de uma refeição hiperlipídica e de alto índice glicêmico após a refeição, evitando o quadro de endotoxemia metabólica e o aumento da SOCS-3 e da expressão gênica dos receptores TLR4 e TLR2 em células mononucleares do sangue periférico, sendo este efeito do suco de laranja atribuído aos flavonoides, naringenina e heperidina (GHANIM et al., 2010).

Estudos *in vivo*, também têm demonstrado os efeitos benéficos do suco de laranja sanguínea, principalmente, sobre o controle da massa corporal. Em camundongos alimentados com ração hiperlipídica, a ingestão do suco de laranja sanguínea Moro, durante doze semanas, inibiu o acúmulo de gordura no tecido adiposo (TITTA et al., 2010), ao mesmo tempo em que limitou o ganho de massa corporal (SALAMONE et al., 2012). Em humanos com excesso de peso, a administração de 400 mg/dia de extrato suco de laranja sanguínea Moro, resultou em redução do IMC após 12 semanas de suplementação (CARDILE et al., 2015). Por outro lado, 11 indivíduos obesos que ingeriram, diariamente, durante 12 semanas, 500 mL de uma mistura comercial dos sucos das laranjas Moro, Torocco e Sanguinello, não apresentaram redução da massa corporal; todavia, verificou-se redução da concentração plasmática de colesterol total e de LDL-colesterol e aumento da glicemia (AZZINI et al., 2017). Além disso, a ingestão de 200 mL/dia de suco de laranja sanguínea por 2 semanas melhorou a função endotelial por meio do aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico em homens com sobrepeso e obesidade (LI et al., 2020).

Portanto, considerando o potencial nutricional da laranja sanguínea, em especial da variedade Moro, entende-se que a ingestão contínua dessa laranja, respeitando as necessidades nutricionais individuais, seja na forma *in natura* ou pelo suco integral da fruta, pode contribuir com a saúde humana (GROSSO et al., 2013), ainda que como parte de um padrão dietético ocidental (GHANIM et al., 2010; HYSON, 2015).

1.5 JUSTIFICATIVA

O padrão dietético ocidental está fortemente associado à inflamação metabólica, a qual atua na etiologia de diferentes DCNT. Por outro lado, estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que uma dieta saudável, especialmente com maior ingestão de frutas ricas em flavonoides, carotenoides, vitaminas, minerais e fibras, pode auxiliar na redução do risco e no tratamento de DCNT, modulando diversos mecanismos envolvidos na inflamação metabólica induzida pelo padrão de dieta ocidental, em especial na modulação da expressão de miRNA envolvidos no processo inflamatório. Nesse contexto, estudos com a ingestão de alimentos que apresentam potencial para modular a expressão de miRNA e de biomarcadores inflamatórios em indivíduos com sobrepeso, permite gerar novos conhecimentos acerca dos mecanismos envolvidos na inflamação metabólica. Além disso, o estudo de alterações moleculares em células mononucleares do sangue periférico, em resposta a suplementação dietética, pode auxiliar no entendimento dos mecanismos subjacentes aos benefícios dos componentes dietéticos.

A laranja se destaca pelo seu potencial nutricional e econômico, sendo a segunda fruta mais consumida pela população brasileira. Em paralelo, constata-se maior consumo de suco de fruta integral pela população, ao mesmo tempo em que estudos em humanos têm demonstrado, principalmente, um efeito anti-inflamatório após a ingestão crônica do suco de laranja integral. Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo anti-inflamatório ainda não foram completamente elucidados, especialmente quanto ao consumo do suco de laranja sanguínea que apresenta alta concentração de antocianinas. Conseqüentemente, novos estudos que investiguem os mecanismos de interação dos componentes nutricionais presentes no suco de laranja sanguínea Moro com o desenvolvimento da inflamação metabólica e a expressão de miRNA em indivíduos com sobrepeso, poderão fornecer bases para o entendimento dos efeitos dessa fruta na manutenção da saúde e na redução do risco de DCNT, além de incentivar o consumo de laranja pela população e fortalecer a fruticultura.

1.6 HIPÓTESE DO ESTUDO

A ingestão crônica de suco de laranja sanguínea Moro modula o perfil de expressão de miRNA no plasma e em células mononucleares de sangue periférico podendo reduzir a concentração plasmática de biomarcadores pró-inflamatórios e de LPS em mulheres com sobrepeso.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito crônico da ingestão do suco de laranja sanguínea Moro sobre o perfil de expressão de miRNA no plasma e em células mononucleares de sangue periférico e a concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios (IL-6, IL-10, TNF- α , MCP-1, sICAM-1 e sVCAM-1) e de LPS em mulheres com sobrepeso.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da ingestão crônica de suco de laranja sanguínea Moro sobre:

a) A concentração plasmática de insulina, glicose, triacilgliceróis, colesterol, HDL-colesterol e LDL-colesterol;

b) A concentração plasmática de LBP e sCD14;

c) A expressão de genes (*TNF*, *NFKB1*, *RELA*, *NFKBIA*, *IL1*, *IL6*, *IL10*, *TLR2* e *TLR4*) e o conteúdo e a fosforilação de proteínas (TAK1, IKK β , JNK, I κ B α , NF- κ B) envolvidas com a via de sinalização do fator de transcrição NF- κ B em células mononucleares de sangue periférico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo é intervencional e crônico.

3.1 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) (WHO, 1995). O número de participantes foi calculado para fornecer um poder estatístico de 80% (β de 10%), com o intuito de detectar uma diferença de 30% na concentração plasmática de TNF- α após a ingestão crônica do suco de laranja sanguínea Moro, considerando 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 do protocolo experimental por parte das voluntárias, foi adotado um tamanho de amostra de 20 indivíduos ($n = 20$).

As participantes foram recrutadas por meio da fixação 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, localizado nas dependências da Faculdade de Saúde Pública (FSP), na Avenida Dr. Arnaldo, 925. Na entrevista, as voluntárias 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 fornecer por escrito 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 laranja; (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).

As voluntárias que atenderam os critérios de inclusão e aceitaram participar, 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 antecedentes às colheitas, não ingerirem bebida alcoólica 1 semana antes e ficar em jejum 12 horas antes. Todas essas informações foram disponibilizadas através de um cronograma entregue às voluntárias (Anexo 4).

O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da FSP da Universidade de São Paulo (USP) (CAAE: 69382217.9.0000.5421) e registrado na plataforma de Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (ReBEC) (UTN: U1111-1241-4665).

3.1.1 Caracterização das participantes

A massa corporal foi aferida utilizando balança 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 as duas medidas. A partir dos dados de massa corporal e estatura foi calculado o IMC e classificado segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1995). A circunferência 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 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. A pressão arterial foi aferida em Monitor Digital de Pressão Arterial Automático Braço Omron HEM-7113 (Omron Corporation, Kyoto, Japão) com a voluntária sentada e com o braço apoiado, sendo o resultado obtido pela média entre três medidas.

3.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

As colheitas de sangue e as coletas de dados, também foram realizadas no Centro de Saúde Escola Geraldo de Paula Souza, em três dias denominados: Basal (período inicial antes da ingestão de suco), Tempo 1 (após 2 semanas de ingestão de suco) e Tempo 2 (após 4 semanas de ingestão de suco). Nesses dias foram inicialmente aferidas a pressão arterial e a glicemia capilar por meio do sistema de monitorização de glicemia Accu-Chek[®] Active (Roche, Basel, BS, Suíça). Em seguida, foram coletados 30 mL de sangue e oferecido o desjejum para a voluntária. Além disso, foram aferidas a massa corporal, a circunferência da cintura e do quadril e aplicado um recordatório alimentar de 24 horas (RA24h) (Anexo 5) (SELEM et al., 2014). A ingestão de macro e micronutrientes foi analisada por meio da Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (UNICAMP, 2011), da base de dados de composição de alimentos do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2019) e de rótulos de alimentos industrializados. A estimativa da necessidade energética total das participantes foi feita por meio das equações propostas pelo instituto de medicina (IOM) – (do inglês, *Institute of Medicine*) - para mulheres a partir de 18 anos (IOM, 2002).

No Basal, cada voluntária recebeu o número de garrafas correspondente ao consumo diário de 500 mL de suco de laranja sanguínea para ser ingerido durante 2 dias. Posteriormente, foi entregue em domicílio o restante do suco para completar a ingestão de 4 semanas de intervenção. Todas as colheitas de sangue foram posteriores ao jejum alimentar de 12 horas. O tempo 2 foi realizado no dia posterior à ingestão da última garrafa de suco, sendo esse o último dia de colheita de sangue e coleta de dados, completando 4 semanas de intervenção (Figura 3).

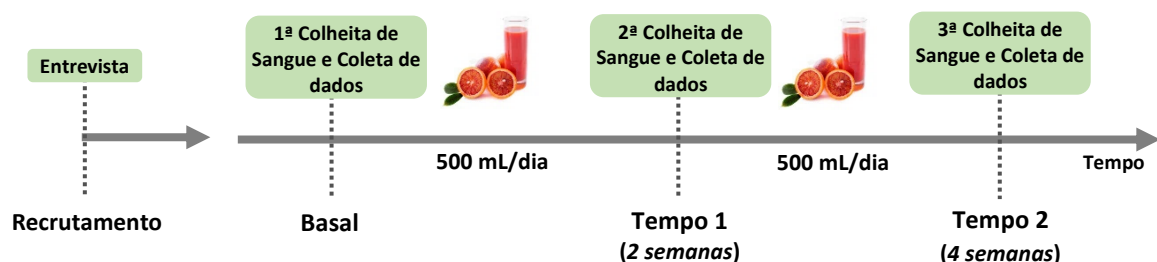


Figura 3. Delineamento do estudo.

3.3 SUCO DE LARANJA SANGUÍNEA MORO

Um único lote de suco de laranja sanguínea Moro, sem adição de água, açúcar e conservantes, foi adquirido da Fundecitrus[®] (Araraquara, São Paulo, Brasil). Para otimizar a biossíntese e o acúmulo de antocianinas na polpa da fruta (CARMONA et al., 2017), após a colheita, todo o lote de laranja usado foi armazenado a 9 °C por 21 dias, ao abrigo da luz e a uma umidade relativa de 90 a 95%. O suco foi extraído com um espremedor industrial e filtrado através de uma peneira metálica com um poro de 0,8 milímetros, pasteurizado entre 85 e 95 °C, por 30 segundos, seguido de 30 segundos de resfriamentos a 0 °C e então distribuído em garrafas plásticas de 1 litro. Em seguida, o suco foi transportado sobre refrigeração para o Laboratório de Genômica Nutricional e Inflamação (GENUIM) da FSP/USP (São Paulo, capital) e foi acondicionado em freezer (-18 °C) durante todo o estudo.

3.3.1 Caracterização do suco de laranja sanguínea Moro

As amostras do suco foram analisadas no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo, capital, em triplicata nos seguintes parâmetros:

- a) Quantificação de sólidos solúveis - Grau Brix (°Brix)

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

- b) Determinação do pH

Foi utilizado pHmetro modelo Metrohm 827 pH Lab Meter Swissmade (Metrohm AG, Herisau, Suíça).

c) Açúcares totais

Amostras dos sucos foram filtradas em filtros PTFE (Millipore Ltda., Bedford, USA) de 0,45 μm de poro e posteriormente analisados por sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado a um detector pulsoamperométrico (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.

d) Determinação de fenólicos totais

O método utilizado foi o descrito por Swain e Hillis (1959), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e ácido gálico como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Hewlett Packard, modelo 8453) no comprimento de onda de 765 nm. Os resultados foram expressos como miligramas (mg) de equivalente de ácido gálico (AG) por 100 mL de suco.

e) Ácidos orgânicos

As amostras de suco foram filtradas em filtros PTFE (Millipore Ltda., Bedford, USA) de 0,45 μm de poro. 200 μL de amostra foram diluídas em 800 μL de água nanopura. Em seguida, 5 μL da amostra de suco diluída foram injetados em sistema de CLAE com detector de arranjo de diodo (DAD) (Hewlett-Packard 1100, Agilent), em coluna $\mu\text{Bondpack C18}$ (300 mm x 3.6 mm i.d., Waters, Milford, MA), com fase móvel de ácido fosfórico a 0,1% e com um fluxo de 0,5 mL/min. O monitoramento foi feito a 210 nm. As amostras foram injetadas em triplicatas e os resultados expressos em mg/100 mL de suco. Os ácidos orgânicos foram identificados a partir do tempo de retenção e similaridade do espectro de absorção em comparação aos padrões comerciais. Os padrões dos ácidos málico, succínico, cítrico,

ascórbico e tartárico foram utilizados para a construção das curvas de calibração utilizando cinco pontos de concentração e aplicados em triplicata (PASTERNAK et al., 2005).

f) Fibras alimentares

O teor de fibra alimentar total e frações foram medidos de acordo com o método descrito pela Associação de Químicos Analíticos Oficial, do inglês, *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (AOAC 991.43) (AOAC, 1995).

g) Capacidade antioxidante

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método de capacidade de absorção do radical oxigênio (*Oxygen radical assay capacity* - ORAC) (PRIOR et al., 2003), as soluções de fluoresceína 40 nM e 2,2'-azobis 153 mM (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) foram preparadas em tampão fosfato 75 mM, pH 7,1. Alíquotas de 25 µL de tampão (branco) ou 25 µL de solução Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,6,8-tetrametilcromam-2-carboxílico) (curva de calibração) ou 25 µL de amostra do suco, devidamente diluídas, foram distribuídas em microplaca de poliestireno de fundo chato com 96 poços seguidas da adição de 150 µL de solução de fluoresceína e incubadas a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, a reação foi iniciada pela adição de 25 µL de AAPH. A leitura da intensidade de fluorescência (485 nm de excitação/525 nm de emissão) foi realizada a cada 1 minuto durante 60 minutos de reação, utilizando-se leitor de microplaca Synergy H1 (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA). A capacidade antioxidante foi calculada pela área abaixo da curva de uma amostra subtraindo-se a área correspondente à do branco (solução tampão). Foi utilizada curva de calibração tendo o Trolox como padrão, efetuada a cada ensaio, nas concentrações de 6,25 a 100 µM. Os resultados foram expressos em µmol de equivalentes de Trolox/100 mL de suco.

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método de captação do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (BRAND-WILLIAMS et al., 1995), foi preparada uma solução de DPPH (0,05 mM) em metanol. A análise foi realizada em microplaca de poliestireno de fundo redondo com 96 poços, no qual cada poço foi preenchido com 200 µL da solução de DPPH, 40 µL de metanol (branco), ou o mesmo volume para a solução de

Trolox (curva de calibração), nas concentrações entre 20 e 70 μM , ou amostras, devidamente diluídos, quando necessário. A leitura de absorbância a 517 nm foi realizada em leitor de microplaca Synergy H1 (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) após 20 minutos de incubação ao abrigo da luz. A capacidade antioxidante foi calculada a partir da seguinte fórmula: % descolorimento do DPPH = $[A (\text{Branco}) - A (\text{Amostra}) \div A (\text{Branco})] \times 100$. Os resultados foram expressos em μmol Trolox equivalente/mL amostra. Onde, A (Branco) refere-se à absorbância do branco e A (Amostra) refere-se à absorbância da amostra.

h) Identificação e caracterização de flavonoides

Amostras de suco integral foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi eluído em coluna de 1 g de poliamida (CC 6, Macherey-Nagel), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology), previamente pré-condicionadas pela passagem de metanol seguido por água deionizada. Após a passagem do extrato, a coluna foi lavada com água deionizada e a eluição dos compostos foi realizada com metanol e posteriormente com metanol: NH_3 (99,5:0,5, v/v). Os eluatos foram completamente secos por meio de rotaevaporação (Rotavapor, RE 120, Büchi, Flawil, Suíça), sob vácuo, a 40 °C. As amostras foram ressuspensas com metanol acidificado com ácido acético 5%, em seguida foram filtrados em filtros PTFE (Millipore Ltda., Bedford, EUA) de 0,45 μm de poro. No precipitado foram adicionados 20 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), em seguida, as amostras foram mantidas sobre agitação em temperatura ambiente *overnight*. Posteriormente foi filtrado em filtros PTFE (Millipore Ltda., Bedford, EUA) de 0,45 μm de poro. Os compostos fenólicos foram identificados por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas em tandem e ionização por electrospray (LC-ESI-MS/MS) e quantificados por CLAE-DAD.

A identificação de compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS foi conduzida em um espectrômetro de massa tipo *ion trap*, modelo Esquire HCT (Bruker Daltonics, Alemanha), acoplado a um cromatógrafo líquido modelo Prominence (Shimadzu, Japão) e interface de ionização por *electron spray* (ESI). As condições de separação foram as mesmas utilizadas para CLAE-DAD. Após a passagem pelo DAD, o fluxo foi alterado para 0,2 mL/min para a passagem no espectrômetro de massa. O ESI foi mantido em modo positivo para

antocianinas e modo negativo para os demais flavonoides. O detector de massas foi programado para realizar *full scan* entre m/z 100-1000. A energia de ionização foi de 3000-3500 V. Os compostos foram identificados pela comparação do espectro de massas obtido com os padrões comerciais e/ou dados da literatura.

A quantificação de flavanonas cítricas foi realizada por CLAE em equipamento Agilent 2100 e detector de DAD. Para a detecção de flavanonas foi utilizada a coluna Prodigy 5 μ ODS3 (250 x 4,60 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido) com fluxo de 1 mL/min, a 25 °C. A eluição foi realizada com gradiente de solventes constituído por (A) 0,5% ácido fórmico em água e (B) 0,5% ácido fórmico em acetonitrila. O gradiente de concentração dos solventes constituiu em 8% de B no início, 10% em 5 min, 17% em 10 min, 25% em 15 min, 50% em 25 min, de 90% em 30 min, 50% em 32 e 8% em 35 min – o tempo total de corrida foram de 35 minutos. O comprimento de onda para a leitura foi de 280 nm.

Quanto a detecção de antocianinas, foi utilizada a coluna Prodigy 5 μ ODS3 (250 x 4,60 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido), com fluxo 0,8 mL/min, a 25 °C. A eluição realizada com gradiente de solventes constituídos por (A) água/ ácido fórmico/ acetonitrila (96:1:3 v/v/v) e (D) água/ ácido fórmico/ acetonitrila (48:1:51 v/v/v). O gradiente de concentração dos solventes constituiu em 10% de D no início, 25% em 10 min, 31% em 15 min, 40% em 20 min, 50% em 30 min, 100% em 40 min, 10% em 45 min e 10% em 50 min – o tempo total de corrida foi de 50 minutos. O comprimento de onda para a leitura foi de 525 mn. A quantificação foi realizada utilizando curva de calibração com padrões de flavonoides e ácidos fenólicos identificados.

i) Identificação e caracterização de carotenoides

Aproximadamente 2 g de suco de laranja e 10 g de sobrenadante foram extraídos exaustivamente (cinco vezes) com acetona de acordo com o método descrito por De Rosso e Mercadante (2007). Na_2CO_3 foi usado para prevenir a formação de componentes não desejáveis durante as análises (PETRY e MERCADANTE 2018). Os extratos foram transferidos para éter de petróleo/éter dietílico e saponificados *overnight* com KOH a 10% em metanol. Os extratos saponificados foram lavados com água destilada até pH 7, o solvente foi evaporado e os extratos foram armazenados a -35 °C até serem analisados.

Os carotenoides foram separados por CLAE -DAD-MS/MS em uma coluna C30 YMC (5 μm , 250 mm \times 4,6 mm), usando um gradiente de eluição de metanol e éter tert-metil butílico e as condições descritas por Petry e Mercadante (2018). O equipamento consistia em um CLAE Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com um módulo composto por duas bombas (LC-20AD), desgaseificador (DGU-20A3R), injetor automático (SIL-20A HT), acoplado em série a um DAD (SPDM20A), e um espectrômetro de massa com um analisador de armadilha de íons usando uma fonte de ionização química de pressão atmosférica (APCI) (AmaZon Speed ETD, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As condições de MS foram as mesmas descritas por Chisté e Mercadante (2012). Os espectros de UV-Vis foram obtidos entre 250 e 600 nm, e os cromatogramas foram processados em 450 nm, 400 nm, 348 nm e 286 nm. Os espectros de massa foram adquiridos com faixa de varredura de m/z 100 a 650.

Os carotenóides foram identificados de acordo com as características dos espectros de UV-Vis e MS/MS e comparação com padrões específicos. A quantificação foi feita por curvas de calibração de (all-E)-luteína, (all-E)-zeaxantina, (all-E)- β -criptoxantina e (all-E)- β -caroteno. Os isômeros Z foram quantificados usando a curva do isômero correspondente (all-E), (all-E)-violaxantina, (all-E)-antheraxantina, (all-E)-luteoxantina, mutatoxantina e seus (Z)-isômeros foram quantificados usando a curva de luteína. A curva de (all-E)- β -caroteno foi usada para quantificação de fitoeno, fitoflueno e ζ -caroteno.

3.4 PREPARO DO SANGUE

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos sem anticoagulante com gel de separação e em tubos contendo anticoagulante EDTA K3 e citrato de sódio. Após a colheita, o sangue foi homogeneizado vertendo os tubos com anticoagulante cuidadosamente 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 menor que 12 g/dL foi adotada como critério de inviabilidade de participação no estudo, uma vez que pode estar relacionada com a 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 aliquoteado e utilizado para a avaliação de miRNA, LPS, LBP, sCD14, insulina, leptina, adiponectina e biomarcadores inflamatórios. O plasma obtido a partir do tubo de citrato foi aliquoteado e utilizado para a avaliação da concentração plasmática de fibrinogênio. O soro obtido a partir do tubo sem anticoagulante foi utilizado para a avaliação do perfil lipídico, PCR, gama glutamil transferase (GGT); alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), amilase, ureia, creatinina e minerais.

3.4.1 Separação das células mononucleares

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) – do inglês, *Peripheral Blood Mononuclear Cells* – são constituídas principalmente por linfócitos (células T e células B) e monócitos, sendo facilmente coletadas por meio da colheita de sangue venoso. Essas células estão envolvidas nas respostas imune e inflamatória (SEN et al., 2017). 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 da expressão gênica e conteúdo proteico (DE MELLO et al., 2012; TOMÉ-CARNEIRO et al., 2013). Diante desses fatos, optou-se por utilizar as PBMC para a análise de expressão gênica e o conteúdo e a fosforilação de proteínas envolvidas na via de sinalização do NF- κ B e MAPK.

Para a obtenção de PBMC após a retirada do plasma, o sangue remanescente nos tubos de EDTA K3, foi reconstituído com o mesmo volume de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril e homogeneizado cuidadosamente. Em 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, foi possível observar a separação das fases: o 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. A solução com as células foi centrifugada 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 foi utilizado para ressuspender o pellet. 20 µL da suspensão de células foi adicionado em 380 µL (1:20) de solução de azul de trypan a 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.

3.4.2 Análises bioquímicas

Glicemia de jejum 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. A sensibilidade do tecido à insulina foi avaliada pelo modelo de avaliação de homeostase (HOMA). A glicemia e a insulinemia foram utilizadas para calcular o índice de sensibilidade à insulina (HOMA-IR), utilizando a seguinte equação: $HOMA - IR = \text{glicose} \times \text{insulina} \div 22,5$.

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 avaliadas

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. Os valores de referência são apresentados em anexo (Anexo 6).

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 et al., 2015) e o índice de Castelli 2 foi calculado pela relação colesterol LDL/HDL, sendo o valor maior que 2,9 indicativo de risco cardiovascular (MILLÁN et al., 2009). A relação AST/ALT foi calculada e incluída como índice para avaliação 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 e CASH, 2012).

3.4.3 Análise da expressão de mRNA em PBMC por RT-qPCR

1×10^6 células foram lisadas em tampão RLT (Qiagen, Hilden, ME, Alemanha) suplementado com β -mercaptoetanol e transferidas para homogeneização na coluna Qiashtredder® (Qiagen, Hilden, ME, Alemanha). Em seguida, o homogeneizado foi purificado a partir do Mini 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 a remoção de DNA. Por fim, o mRNA extraído foi eluído em 30 a 50 μ L de água livre de RNase. 1 μ L 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. Uma reação catalisada pela enzima transcriptase 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).

1 μ L de cDNA (10 ng/ μ L) foi adicionado em 5 μ L de TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2x), 0,5 μ L 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. A amplificação foi realizada no StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) conforme as especificações de tempo e temperatura indicadas no manual dos produtos. Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar (do inglês, *Ct*, *cicle threshold*). O cálculo de expressão relativa dos genes foi normalizado pela diferença entre ΔCt das amostras (Ct do gene alvo – Ct do gene endógeno constitutivo) e a média obtida do ΔCt no *baseline*, resultando nos valores de $\Delta\Delta Ct$ de cada amostra. O cálculo da expressão de cada gene avaliado foi feito com base na equação descrita por Livak e Schmittgen (2001): Expressão relativa = $2(-\Delta\Delta C(T))$ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

3.4.4 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 2 µL de RNA extraídos do plasma e 10 ng de RNA extraídos das PBMC, foram transcritos de modo reverso a partir do kit Universal II para síntese de cDNA. Em cada reação de transcrição reversa foi incluindo 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 miRNA foi analisado uma vez por RT-qPCR usando kit ExiLent SYBR® Green master mix (Qiagen, Hilden, ME, Alemanha). Inicialmente, para verificar o aumento ou diminuição da expressão de miRNA após a intervenção com o suco de laranja sanguínea Moro, foram analisados dois painéis da 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 ($p < 0,05$) ($n = 8$) e alguns que estão envolvidos com o processo inflamatório (FOLEY e O'NEILL, 2012; MA et al., 2018; XU et al., 2013; ZHU et al., 2013), mas não foram diferencialmente expressos, tiveram suas concentrações analisadas no plasma e em PBMC nas demais participantes do estudo ($n = 12$). 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 sintéticos não encontrados na amostra analisada e utilizados para a (i) calibração da extração do RNA (UniSp2, UniSp4, UniSp5), (ii) controle da síntese de cDNA (UniSp6) e (iii) verificação do processo de amplificação por RT-qPCR inter-

placas (UniSp3). Sua utilização permite constatar a presença de inibidores na síntese de cDNA e no RT-qPCR, bem como a presença de nucleases (BLONDAL 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 por hemólise. Para verificação de hemólise nas amostras de plasma foram utilizados dois miRNA. Um que é expresso em eritrócitos (miR-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 serem afetadas pela hemólise. Amostras com proporções menores geralmente não são afetadas pela 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 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 e grupos de quatro semanas 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 $< 0,05$ e variação absoluta do *cut-off* do *fold change* (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 (IPA) v8.0-2602 (Ingenuity® Systems) que 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 moderada confiabilidade), o contexto biológico, tipo de célula ou tecido e doença. 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).

3.4.5 Análise de proteínas por *Western Blotting*

As PBMC foram lisadas em tampão RIPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com o inibidor de fosfatase [ortovanadato (10 mM)] e protease [coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), flureto de sódio (NaF) 1M e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 22,96 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.

10 µg de proteínas totais de PBMC foram resolvidas por eletroforese em gel de policrilamida (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 das membranas com solução bloqueadora de Albumina Bovina Sérica (BSA), 5% diluída em solução salina tamponada com Tris e suplementada com detergente Tween® a 0,1% (TBST) (Tris 10 mM, NaCl 1.5 mM e Tween® 20). Posteriormente, as membranas foram incubadas por 4 horas em temperatura ambiente com anticorpos específicos da via de sinalização da MAPK e do NF-κB [TAK1 (#5206), fosfo-TAK1 Thr184/187 (#4508), IKKβ (#8943), fosfo-IKKα/β Ser176/180 (#2697), JNK (#3708), fosfo-SAPK/JNK Thr183/Tyr185 (#4668), IκBα (#9242), fosfo-IκBα Ser32 (#2859), NF-κB e fosfo-NF-κB p65 Ser536 (#3031)] e β-actina (#8457) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA). 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.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados em média e erro padrão médio ($\bar{X} \pm \text{EPM}$). Os tempos 2 e 4 semanas 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.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Foram entrevistadas 40 mulheres, dentre as quais foram recrutadas 25 voluntárias que atendiam aos critérios de inclusão. As voluntárias apresentavam sobrepeso (IMC de 25,0 a 29,9 kg/m²), risco elevado de complicações metabólicas (circunferência da cintura \geq 80 cm) (WHO, 2008) e indicativo da presença de resistência à insulina (HOMA-IR > 2,70) (GELONEZE et al., 2009). A caracterização das voluntárias está descrita na tabela 2. No decorrer do estudo, houve o desligamento de duas voluntárias que apresentaram hemoglobina inferior a 12 g/dL, inviabilizando a doação de sangue, e de uma voluntária que relatou o uso de medicamento anti-inflamatório (Ibuprofeno). Além disso, duas voluntárias não concluíram as três colheitas de sangue.

Tabela 2. Caracterização das participantes no período basal do estudo.

	Caracterização
Idade (anos)	27,5 \pm 1,5
Massa corporal (kg)	74,4 \pm 1,4
Estatura (m)	1,64 \pm 0,02
Índice de massa corporal - IMC (kg/m ²)	27,8 \pm 0,3
Necessidade energética total (kcal/dia)	2277 \pm 122
Circunferência da cintura (cm)	89,1 \pm 1,1
Razão cintura-quadril (RCQ)	0,83 \pm 0,01
Pressão arterial sistólica (mmHg)	113 \pm 2
Pressão arterial diastólica (mmHg)	69,7 \pm 1,8
HOMA-IR	3,05 \pm 0,34
Hemoglobina (g/dL)	13,6 \pm 0,3

Valores são médias e EPM, n = 20. Abreviações: HOMA-IR, modelo de avaliação da homeostase de resistência à insulina.

4.2 COMPOSIÇÃO DO SUCO DE LARANJA SANGUÍNEA MORO

A caracterização do suco de laranja sanguínea Moro é apresentada na tabela 3. O suco apresentou maior concentração de sacarose em relação aos outros açúcares solúveis analisados, contribuindo com a ingestão de 52,6 g/dia de açúcares e 249,6 kcal por dia. Em relação aos ácidos orgânicos analisados o suco apresentou maior concentração de ácido cítrico em relação aos outros ácidos. No que se refere ao conteúdo de fibra alimentar, embora o suco seja integral, a bebida apresentou pequena concentração de fibras solúvel e insolúvel. O suco também apresentou um pH ácido, um teor de 6,5% de sólidos solúveis, uma concentração de fenólicos totais de 45,75 mg/100 mL e uma capacidade antioxidante de 856,73 μ mol eq. Trolox/100 mL pelo método de ORAC e percentual de inibição de 50,70 para o DPPH.

Tabela 3. Parâmetros de qualidade, fenólicos totais, ácidos orgânicos, fibra alimentar e capacidade antioxidante do suco pasteurizado de laranja sanguínea Moro.

	<u>Suco de laranja</u>		<u>Suco de laranja</u>
Açúcares Solúveis ¹		Ácidos Orgânicos ³	
Sacarose	4,84 \pm 0,03	Ácido Cítrico	1245 \pm 16
Frutose	2,96 \pm 0,03	Ácido Málico	193 \pm 4
Glicose	2,73 \pm 0,04	Ácido Succínico	ND
Total	10,52	Ácido Ascórbico	47,4 \pm 1,0
pH	4,14 \pm 0,00	Ácido Tartárico	ND
TSS (°Brix)	6,50 \pm 0,00	Fibra Alimentar ¹	
Fenólicos Totais ²	45,7 \pm 0,0	Fibra Insolúvel	0,20 \pm 0,02
ORAC ⁴	857 \pm 2	Fibra Solúvel	0,11 \pm 0,00
DPPH ⁵	50,7 \pm 0,6	Total	0,31

Valores expressos como média \pm EPM. ¹ valores expressos em g/100 mL; ² valores expressos em mg de ácido gálico/100 mL; ³ valores expressos em mg/100 mL; ⁴ valores expressos em μ mol de equivalentes de Trolox/100 mL de suco; ⁵ percentual de inibição. Abreviações: ORAC, capacidade de absorção do radical oxigênio; DPPH, 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; TSS, teor de sólidos solúveis; ND, não detectado.

Na tabela 4 e figura 4 estão apresentados os principais flavonoides identificados do suco de laranja sanguínea Moro por LC-ESI-MS/MS.

Tabela 4. Espectro de massas de flavonoides de suco de laranja sanguínea Moro, obtido por LC-ESI-MS/MS, modo negativo.

Composto identificado	Pico	TR (min)	[M – H] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z)
Apigenina 6,8-di-C-glucosídeo (Vicenin-2)*	1	8.1	593	473/353
Quercetina-3-O-rutinosídeo (Rutina)*	2	12.6	609	563/301
Naringenina-7-O-rutinosídeo (Narirutina)*	3	16.6	579	271
Hesperitina-7-O-rutinosídeo (Hesperidina)*	4	19.0	609	301
Quercetina-3-O-glucosídeo*	5	21.6	463	301
Isosakuranetin 7-rutinosídeo (Didimina)*	6	24.6	593	285

*Identidade confirmada com padrão externo. Abreviação: TR, tempo de retenção.

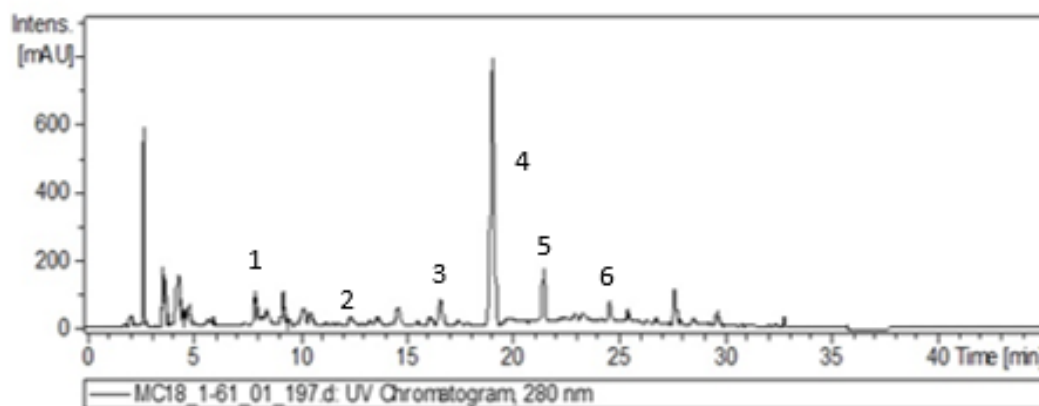


Figura 4. Cromatograma obtido por LC-ESI-MS/MS de suco de laranja sanguínea Moro em modo negativo.

Na tabela 5 e figura 5 são apresentadas as principais antocianinas identificadas no suco de laranja sanguínea Moro por LC-ESI-MS/MS.

Tabela 5. Espectro de massas de antocianinas do suco de laranja sanguínea Moro obtido por LC-ESI-MS/MS, modo positivo.

Composto identificado	Pico	TR (min)	λ_{\max} (nm)	[M] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z)
Delfinidina-3-O-glicosídeo	1	11.6	523	465	303
Cianidina-3-O-galactosídeo	2	12.5		449	287
Cianidina-3-O-glicosídeo*	3	13.3	280/516	449	287
Peonidina-3-O-glicosídeo	4	15.9		463	301
Petunidina-dihexosídeo-ramnosídeo		16.1		787	641/479/317
Delfinidina-malonyl-glicosídeo		16.2		551	465/303
Cianidina-3-O-(6"-malonyl glicosídeo)		16.2		535	287
Cianidina-3-O-(6"-dioxyalyl) glicosídeo	5	17.3		593	287
Cianidina-3-O-(6"-malonyl glicosídeo)	6	18.1	280/517	535	449/287
Cianidina-3-O-(6"-dioxyalyl glicosídeo)	7	19.1	520	593	287
**ND	8	20.3	520	607	301/287
Cianidina 3-sulforosídeo		20.4		611	449/303
Derivado de cianidina	9	21.3	520	549	449/287
Derivado de cianidina	10	21.8	520	679	287
Derivado de cianidina				607	287
Derivado de delfinidina	11	24.0		693	465/303
Derivado de cianidina	12	24.6		693	593/287/257

*Identidade confirmada com padrão externo. Abreviação: TR, tempo de retenção.

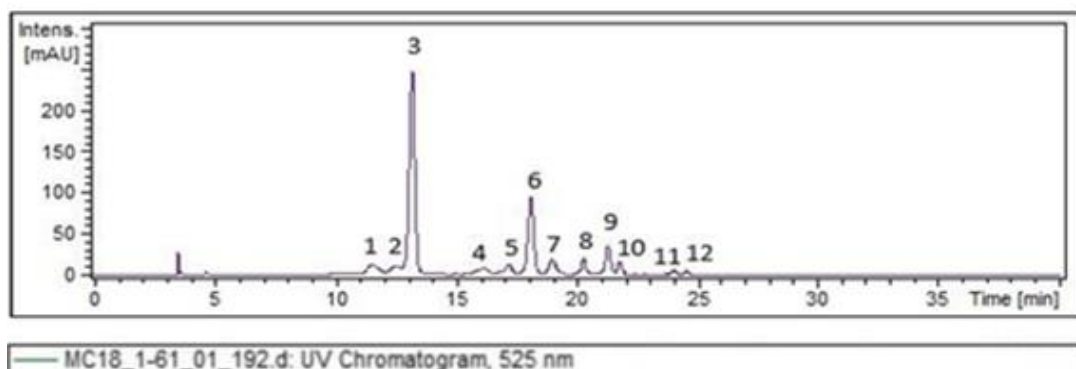


Figura 5. Cromatograma obtido por LC-ESI-MS/MS de suco de laranja sanguínea Moro em modo positivo.

Na tabela 6 é apresentada a quantificação de flavonoides encontrados no suco. A ingestão do suco forneceu 291 mg/dia de flavonoides totais. O flavonoide com maior concentração foi a hesperidina, seguida da antocianina cianidina-3-O-glicosídeo (C3G).

Tabela 6. Conteúdo de flavonoides no suco de laranja sanguínea Moro.

Compostos	Suco de laranja	
	Total	Percentual (%)
Narirutina	4,19 ± 0,72	7,20
Hesperidina	36,5 ± 8,2	62,7
Didimina	1,90 ± 0,49	3,26
Naringina	0,33 ± 0,01	0,57
Naringenina	0,11 ± 0,01	0,19
Hesperitina	0,09 ± 0,01	0,15
Cianidina-3-O-glicosídeo (C3G)	12,2 ± 1,0	21,0
Cianidina-3-O-(6"-malonyl glicosídeo)	2,89 ± 0,66	4,96
Flavanonas totais	43,1	74,0
Antocianinas totais	15,1	26,0
Flavonoides totais	58,2	100

Valores expressos em mg/100 mL de suco (média ± EPM).

A tabela 7 apresenta uma compilação geral do conteúdo de carotenoides majoritários e dos isômeros identificados no suco de laranja sanguínea Moro. Os valores apresentados são uma somatória dos isômeros identificados. A ingestão do suco forneceu 2541,5 µg/dia de carotenoides, sendo que o componente com maior concentração foi o caroteno total, seguido dos derivados luteoxantina, mutatoxantina e luteína.

Tabela 7. Conteúdo de carotenoides no suco de laranja sanguínea Moro.

Compostos	Total
Violaxantina ((all-E) + (9Z))	66,1
Luteoxantina ((all-E) + (9Z) or (9'Z))	77,2
(all-E)-luteína	66,5

continua

Tabela 7. Conteúdo de carotenoides no suco de laranja sanguínea Moro.

Compostos	Total
Mutatoxantina (epimer 1+ epimer 2+ epimer 3)	72,3
(all- <i>E</i>)-zeaxantina	31,6
(all- <i>E</i>)-β-criptoxantina	59,0
(9 <i>Z</i>)-anteraxantina	40,8
Caroteno total ((all- <i>E</i>) + ζ-caroteno isômero 1 e 2)	94,8
Carotenoides totais	508,3

Valores expressos em µg/100 mL de amostra extraída do suco.

4.3 EFEITO DA INGESTÃO DO SUCO DE LARANJA SANGUÍNEA MORO SOBRE O PADRÃO DIETÉTICO

O padrão dietético das participantes, analisado a partir do RA24h, é apresentado na tabela 8. Conforme é observado no padrão de dieta ocidental (CHRIST et al., 2019), a ingestão de colesterol e AGS foi superior ao recomendado, ou seja, inferior a 300 mg/dia e menor que 10% do VCT, respectivamente (WHO, 2003). Além disso, a ingestão de fibras estava abaixo dos 25 g/dia recomendados para mulheres adultas (IOM, 2002). Por outro lado, a ingestão do suco de laranja aumentou a ingestão de vitamina C ($p < 0,001$), sem alterar a ingestão de calorias, macronutrientes, colesterol e fibra alimentar.

Tabela 8. Estimativa da ingestão diária de calorias, macronutrientes, fibras alimentares e vitamina C das participantes, no período basal e 2 e 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL de suco de laranja sanguínea Moro.

	Basal	2 semanas	4 semanas	p valor
Valor calórico total (VCT) (kcal)	2227 ± 122	2287 ± 88	2309 ± 89	0,52
Proteína (g)	86,2 ± 4,9	91,0 ± 7,0	88,3 ± 6,5	0,84
Proteína por kg de massa corporal (g)	1,17 ± 0,08	1,23 ± 0,10	1,18 ± 0,08	0,84
Lipídio (g)	82,9 ± 6,7	81,4 ± 5,1	84,6 ± 7,4	0,94
% de AGS em relação ao VCT	11,8 ± 0,1	12,0 ± 0,7	11,8 ± 0,1	0,96
Carboidrato (g)	305 ± 18	299 ± 16	289 ± 12	0,75
Colesterol (mg)	358 ± 45	322 ± 40	357 ± 58	0,77

Continua

Tabela 8. Estimativa da ingestão diária de calorias, macronutrientes, fibras alimentares e vitamina C das participantes, no período basal e 2 e 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL de suco de laranja sanguínea Moro.

	<i>continuação</i>			
	Basal	2 semanas	4 semanas	p valor
Fibras alimentares (g)	20,7 ± 2,0	18,7 ± 1,8	15,4 ± 1,5	0,11
Vitamina C (mg)	55,5 ± 17,6	293 ± 18*	268 ± 12*	< 0,001

Valores são média ± EPM, n = 20. * $p < 0,05$ vs basal. Analisado por *One way* ANOVA com pós-teste de Tukey ou Dunn. Abreviações: AGS, ácido graxo saturado; VCT, valor calórico total.

4.4 EFEITO DA INGESTÃO DO SUCO DE LARANJA SANGUÍNEA MORO SOBRE OS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E PRESSÃO ARTERIAL

Na tabela 9 são apresentados os valores relativos à antropometria e à aferição da pressão arterial no período basal e 2 e 4 semanas após a ingestão de suco do laranja sanguínea Moro. A ingestão da bebida não resultou em alterações significativas sobre os parâmetros antropométricos e valores de pressão arterial.

Tabela 9. Composição corporal e pressão arterial avaliados no período basal e 2 e 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL de suco de laranja sanguínea Moro.

Parâmetro	Basal	2 semanas	4 semanas	p valor
Massa corporal (kg)	74,4 ± 1,4	74,7 ± 1,4	74,7 ± 1,4	0,40
Índice de massa corporal (kg/m ²)	27,8 ± 0,3	27,9 ± 0,4	27,9 ± 0,4	0,35
Circunferência da cintura (cm)	89,1 ± 1,1	88,4 ± 1,0	88,5 ± 1,0	0,51
Razão cintura-quadril (RCQ)	0,83 ± 0,01	0,83 ± 0,01	0,82 ± 0,01	0,26
Pressão arterial sistólica (mmHg)	113 ± 2	110 ± 2	111 ± 2	0,17
Pressão arterial diastólica (mmHg)	69,7 ± 1,8	67,8 ± 2,0	67,9 ± 1,4	0,61

Valores são média ± EPM, n = 20. Analisado por *One way* ANOVA com pós-teste de Tukey ou Dunn.

4.5 EFEITO DA INGESTÃO DO SUCO DE LARANJA SANGUÍNEA MORO SOBRE O PERFIL BIOQUÍMICO

A ingestão de suco de laranja sanguínea Moro não resultou em alterações significativas nos parâmetros bioquímicos analisados (Tabela 10).

Tabela 10. Perfil metabólico plasmático e sérico, avaliado no período basal e 2 e 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL de suco de laranja sanguínea Moro.

Parâmetro	Basal	2 semanas	4 semanas	p valor
Glicemia (mg/dL)	80,0 ± 2,8	77,1 ± 2,2	75,8 ± 2,5	0,70
Insulinemia (µUI/mL)	15,2 ± 1,3	14,4 ± 0,9	14,5 ± 1,0	0,95
HOMA-IR	3,05 ± 0,34	2,74 ± 0,9	2,69 ± 0,19	0,82
Adiponectina (pg/mL)	5,29 ± 0,56	5,20 ± 0,54	5,08 ± 0,51	0,43
Leptina (pg/mL)	4,27 ± 0,04	4,30 ± 0,05	4,28 ± 0,03	0,85
Colesterol total (mg/dL)	138 ± 9	143 ± 8	153 ± 7	0,10
HDL-colesterol (mg/dL)	48,4 ± 3,3	46,9 ± 2,3	50,9 ± 3,1	0,32
LDL-colesterol (mg/dL)	72,8 ± 6,1	77,8 ± 6,3	81,7 ± 5,0	0,09
Triacilglicerois (mg/dL)	86,5 ± 9,3	90,8 ± 9,2	95,8 ± 10,4	0,68
Colesterol não-HDL (mg/dL)	90,0 ± 7,5	95,8 ± 7,6	101,6 ± 6,4	0,07
Índice de Castelli II	1,62 ± 0,17	1,72 ± 0,16	1,77 ± 0,17	0,20
Hemoglobina (g/dL)	13,6 ± 0,3	13,5 ± 0,3	13,7 ± 0,3	0,35
Lipopolissacarídeo (EU/mL)	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,45
sCD14 (µg/mL)	2,06 ± 0,07	2,04 ± 0,07	2,02 ± 0,08	0,83
LBP (µg/mL)	13,4 ± 0,9	13,6 ± 1,0	13,1 ± 1,0	0,75
PCR (mg/L)	3,65 ± 1,20	3,61 ± 0,72	3,03 ± 0,79	0,33
Fibrinogênio (mg/dL)	287 ± 16	280 ± 14	282 ± 18	0,81
D-dímero (ng/mL)	484 ± 63	467 ± 51	442 ± 45	0,95
ALT (U/L)	12,8 ± 1,4	12,6 ± 1,1	12,7 ± 0,9	0,96
AST (U/L)	15,1 ± 1,1	20,5 ± 2,6	21,3 ± 2,2	0,42
Índice AST/ALT	1,62 ± 0,17	1,72 ± 0,16	1,77 ± 0,17	0,20
GGT (U/L)	13,8 ± 1,4	14,4 ± 1,3	15,1 ± 1,2	0,23
Amilase (U/L)	52,6 ± 4,5	51,9 ± 3,6	56,6 ± 3,9	0,83
Ureia (U/L)	20,0 ± 1,3	19,9 ± 1,2	21,1 ± 1,0	0,59
Creatinina (mg/dL)	0,64 ± 0,05	0,64 ± 0,03	0,68 ± 0,04	0,54

continua

Tabela 10. Perfil metabólico plasmático e sérico, avaliado no período basal e 2 e 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL de suco de laranja sanguínea Moro.

continuação

Parâmetro	Basal	2 semanas	4 semanas	p valor
Sódio (mEq/L)	124 ± 5	128 ± 3	123 ± 8	0,67
Potássio (mEq/L)	3,78 ± 0,15	3,93 ± 0,08	4,04 ± 0,12	0,19
Cloro (mEq/L)	88,8 ± 4,2	90,0 ± 2,7	92,2 ± 3,1	0,39
Cálcio (mg/dL)	7,93 ± 0,40	8,01 ± 0,27	8,24 ± 0,28	0,61
Magnésio (U/L)	1,70 ± 0,08	1,67 ± 0,05	1,65 ± 0,06	0,17
Ureia (U/L)	20,0 ± 1,3	19,9 ± 1,2	21,1 ± 1,0	0,59

Valores são média ± EPM, n = 20. Analisado por *One way* ANOVA com pós-teste de Tukey ou Dunn. Abreviações: HOMA-IR, modelo de avaliação da homeostase de resistência à insulina; HDL, lipoproteína de baixa densidade; LDL, lipoproteína de alta densidade; sCD14, grupo de diferenciação 14 solúvel; LBP, proteína ligante de lipopolissacarídeo; PCR, proteína C reativa; ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; GGT, gama glutamil transferase.

4.6 EFEITO DA INGESTÃO DO SUCO DE LARANJA SANGUÍNEA MORO SOBRE A EXPRESSÃO DE mRNA

A Figura 6 apresenta a expressão de genes envolvidos com a via de sinalização inflamatória em PBMC. A ingestão de suco de laranja sanguínea Moro não alterou significativamente a expressão dos mRNA analisados.

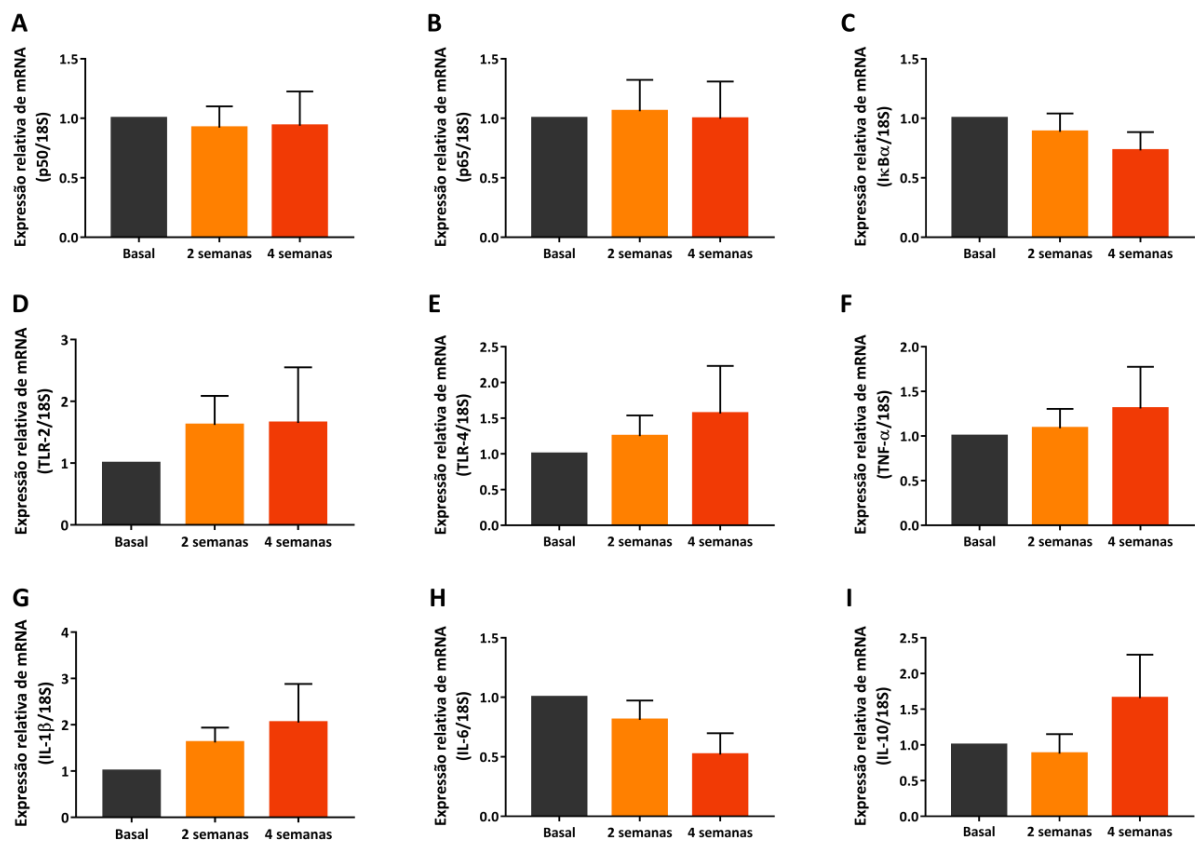


Figura 6. Expressão de mRNA da via inflamatória em PBMC de mulheres com sobrepeso, avaliada no período basal e 2 e 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL de suco de laranja sanguínea Moro. Expressão de *NFKB1* (A), *RELA* (B), *NFKBIA* (C), *TLR2* (D), *TLR4* (E), *TNF* (F), *IL1* (G), *IL6* (H) e *IL10* (I). Os valores são média \pm EPM, n = 12. Analisado por *One way* ANOVA com pós-teste de Tukey ou Dunn. Abreviações: *NFKB1*, fator nuclear kappa B subunidade p50; *RELA*, fator nuclear kappa B subunidade p65; *NFKBIA*, inibidor alfa do fator nuclear kappa B; *TLR*, receptor do tipo *toll*; *TNF*, fator de necrose tumoral alfa; *IL*, interleucina.

4.7 EFEITO DA INGESTÃO DO SUCO DE LARANJA SANGUÍNEA MORO SOBRE A EXPRESSÃO DE miRNA

4.7.1 Controle de qualidade da expressão de miRNA no plasma

O nível constante dos ensaios a partir da utilização de *spike-ins*, apresentado nas Figura 7 e 8, indica que a extração de RNA, a síntese de cDNA e o processo de amplificação por RT-qPCR, tiveram êxito a partir das amostras de plasma, bem como as amostras não foram contaminadas com inibidores. Entretanto, o nível elevado de UniSp6 para a amostra 18C indica inibição da síntese de cDNA, por isso foi necessário removê-la da análise visando permitir a normalização.

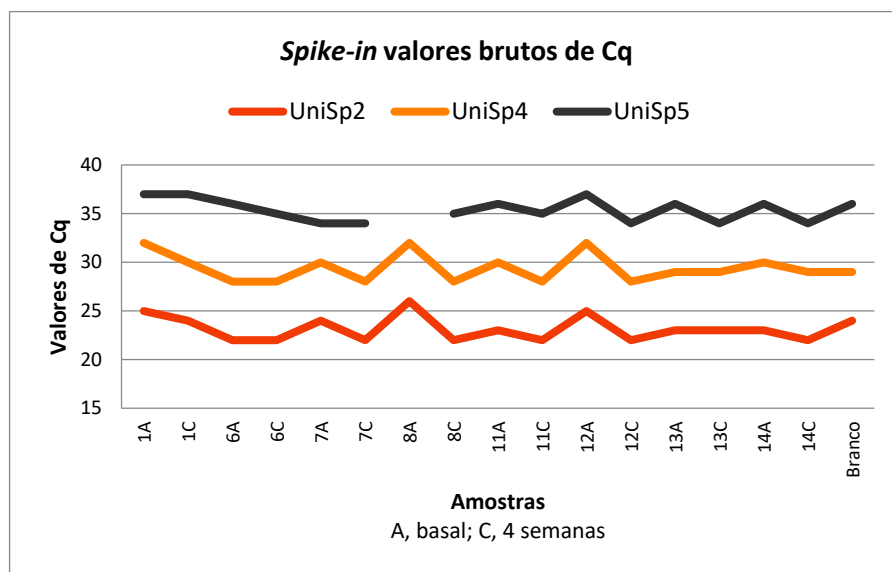


Figura 7. Valores brutos de Cq obtidos para o controle dos ensaios por *RNA spike-in* 2, 4 e 5 em amostras de plasma (n = 8). Abreviações: Cq, ciclo de quantificação; UniSp, do inglês, synthetic RNA spike-in.

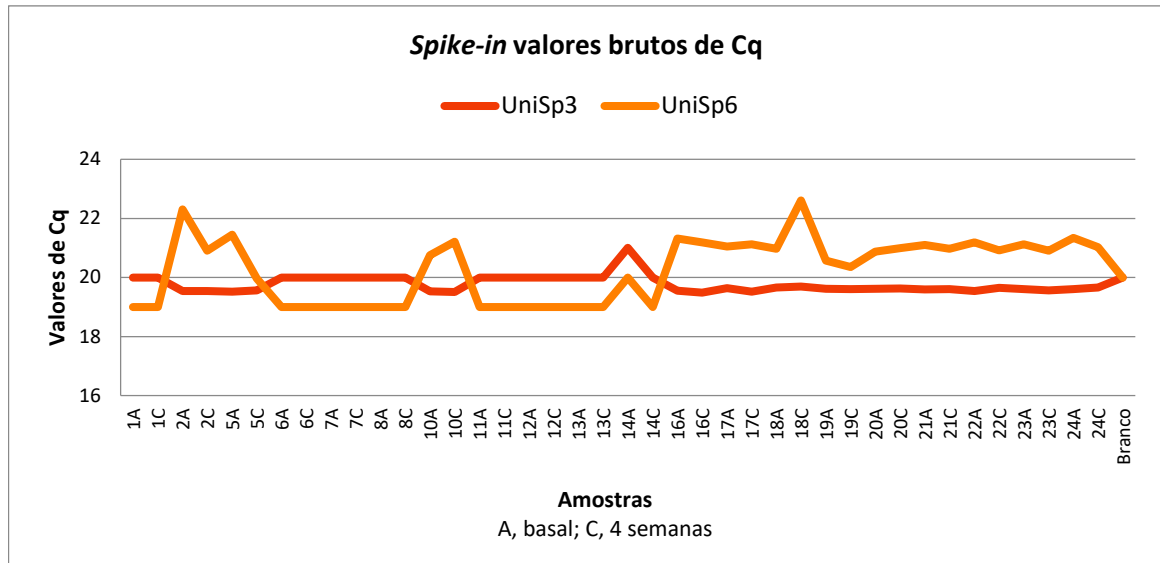


Figura 8. Valores brutos de Cq obtidos para o controle dos ensaios por *RNA spike-in* 3 e 6 em amostras de plasma (n = 20). Abreviações: Cq, ciclo de quantificação; UniSp, do inglês, *synthetic RNA spike-in*.

A Figura 9 apresenta a diferença da razão dCq entre os miR-23a e miR-451 (n = 8). Apenas quatro amostras apresentaram diferenças ligeiramente superiores a 7,0, sugerindo possível contaminação de miRNA oriundo de eritrócitos.

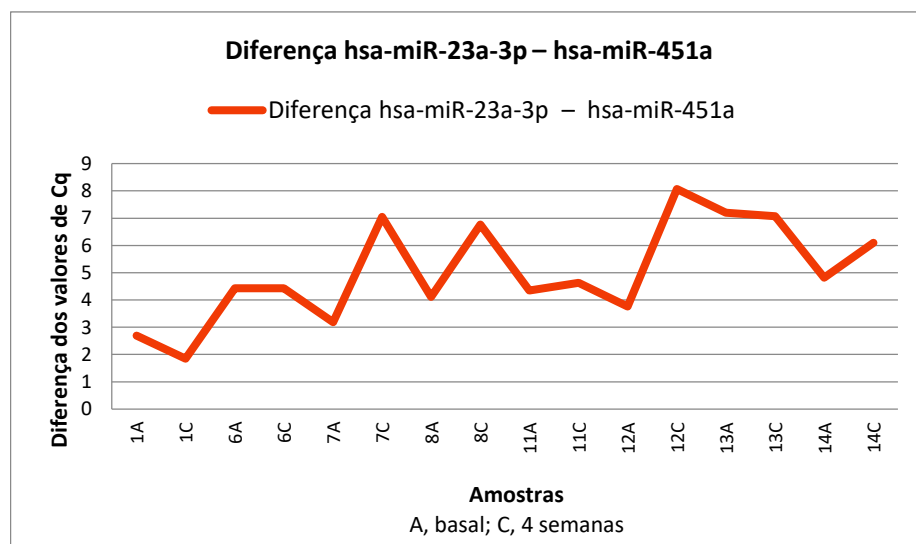


Figura 9. Diferença entre os valores de Cq (miR-23a - miR-451a) obtidos para análise de hemólise nas amostras de plasma (n = 8). Abreviações: Cq, do inglês, *Cycle of quantification*; UniSp, do inglês, *synthetic RNA spike-in*.

4.7.2 Controle de qualidade da expressão de miRNA em PBMC

O nível constante dos ensaios a partir da utilização de *spike-ins*, apresentado nas Figura 10 e 11, indica que a síntese de cDNA e o processo de amplificação por RT-qPCR, tiveram êxito a partir das amostras de PBMC, bem como as amostras não foram contaminadas com inibidores.

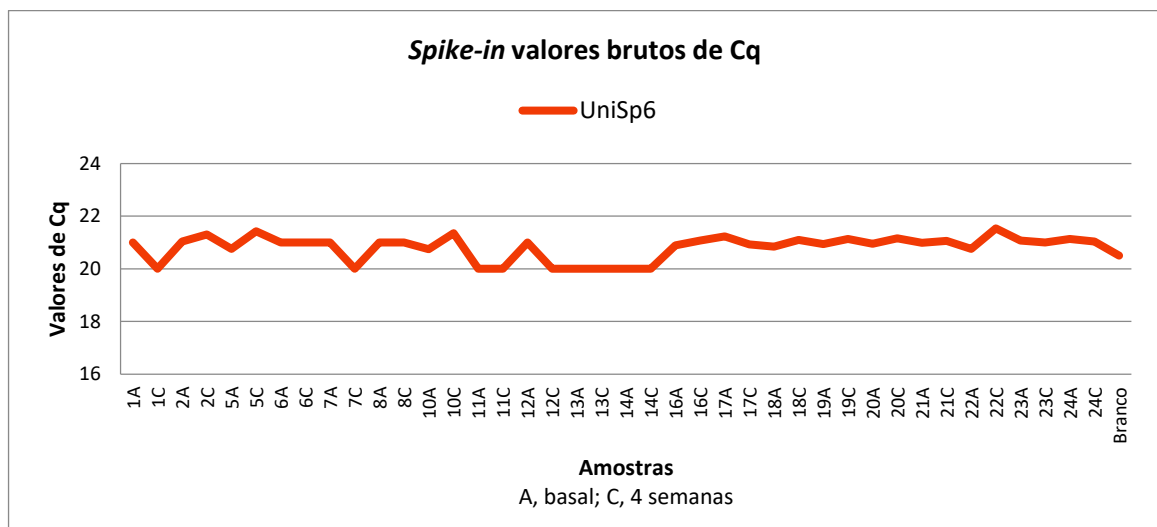


Figura 10. Valores brutos de Cq obtidos para o controle dos ensaios por *RNA spike-in 6* em amostras de PBMC (n = 20). Abreviações: Cq, ciclo de quantificação; UniSp, do inglês, *synthetic RNA spike-in*.

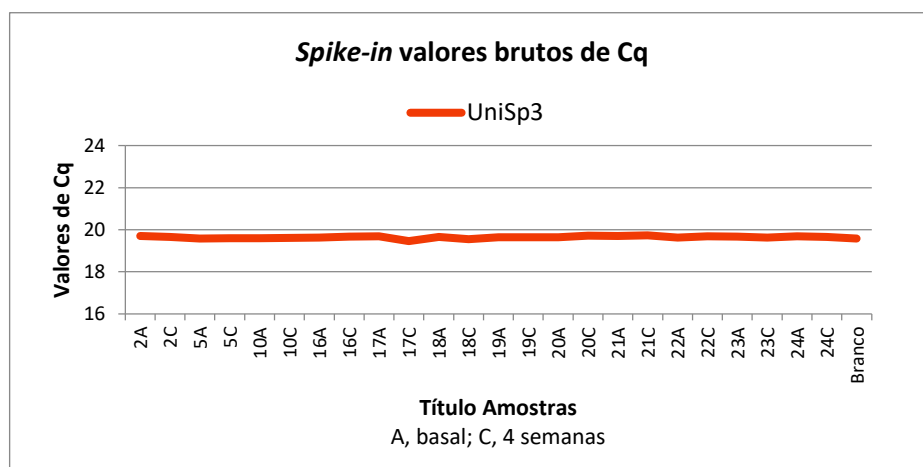


Figura 11. Valores brutos de Cq obtidos para o controle dos ensaios por *RNA spike-in 3* em amostras de PBMC (n = 12). Abreviações: Cq, ciclo de quantificação; UniSp, do inglês, *synthetic RNA spike-in*.

4.7.3 Expressão de miRNA no plasma

A partir dos 179 miRNA analisados em cada amostra (n = 8), foram detectados, em média, 147 miRNA por amostra, sendo que 76 estavam presentes em todas as amostras (Tabela 11).

Tabela 11. Número de miRNA analisados e detectados nas amostras de plasma

	miRNA detectados
<i>miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR Serum/Plasma Focus panel</i>	179
miRNA detectados em todas as amostras	76
Média de miRNA detectados por amostra	147

Dentre os miRNA detectados no plasma, sete tiveram alteração significativa na expressão gênica quando comparada com o período basal, sendo que os miR-148b-3p, miR-106b-5p, o miR-144-3p, miR-30e-5p, miR-15a-5p e hsa-miR-101-3p apresentaram expressão aumentada, e apenas o miR-125b-5p teve a sua expressão reduzida (Tabela 12). A análise completa da diferença de expressão de miRNA entre o período basal e 4 semanas é apresentada em anexo (Anexo 9).

Tabela 12. *Fold change* da expressão plasmática de miRNA que apresentaram significância 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro (n = 8).

miRNA	<i>Fold-change</i>	<i>p valor</i>
hsa-miR-148b-3p	2,68	0,003
hsa-miR-106b-5p	1,84	0,009
hsa-miR-125b-5p	0,52	0,014
hsa-miR-144-3p	2,12	0,022
hsa-miR-30e-5p	1,63	0,024
hsa-miR-15a-5p	1,74	0,031
hsa-miR-101-3p	1,52	0,046

Os miRNA que apresentaram diferença estatística foram analisados nas demais amostras (n = 11), incluindo o hsa-miR-107 (*fold-change* 1,84 e $p = 0,054$) e o hsa-miR-150-5p (*fold-change* 0,63 e $p = 0,059$), os quais estão relacionados à resposta inflamatória (FOLEY e O'NEILL, 2012; MA et al., 2018). Considerando ambas as análises (n = 8 e n = 11), apenas o miR-144-3p apresentou alteração significativa na expressão gênica quando comparada com o período basal (n = 19) (Tabela 13).

Tabela 13. *Fold change* da expressão dos miRNA plasmáticos 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro (n = 19).

miRNA	<i>Fold-change</i>	<i>p</i> valor
hsa-miR-144-3p	1,71	0,02
hsa-miR-107	1,60	0,08
hsa-miR-150-5p	0,73	0,10
hsa-miR-125b-5p	0,68	0,13
hsa-miR-30e-5p	1,26	0,18
hsa-miR-106b-5p	1,22	0,29
hsa-miR-15a-5p	1,21	0,34
hsa-miR-148b-3p	1,22	0,59
hsa-miR-101-3p	0,95	0,80

A localização genômica e o cluster de miRNA previsto para o hsa-miR-144-3p são mostrados na tabela 14.

Tabela 14. Localização cromossômica do miRNA modulado no plasma após a ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro.*

miRNA	Localização cromossômica	Cluster de miRNA
hsa-miR-144-3p	17q11.2	hsa-miR-144; hsa-mir-4732; hsa-mir-451b; hsa-mir-451a

*Disponível em <http://www.mirbase.org/> e <https://www.genecards.org/>

O *heat map* supervisionado dos miRNA expressos no plasma (n=19), apresentado na Figura 12, mostra que não houve nenhum padrão de expressão de miRNA, se agrupados de acordo com o momento basal e após 4 semanas de ingestão do suco. O miR-148b-3p não é apresentado no *heat map*, pois foi analisado a partir do cálculo dos coeficientes parciais, uma vez que não foi detectado em todas as amostras analisadas.

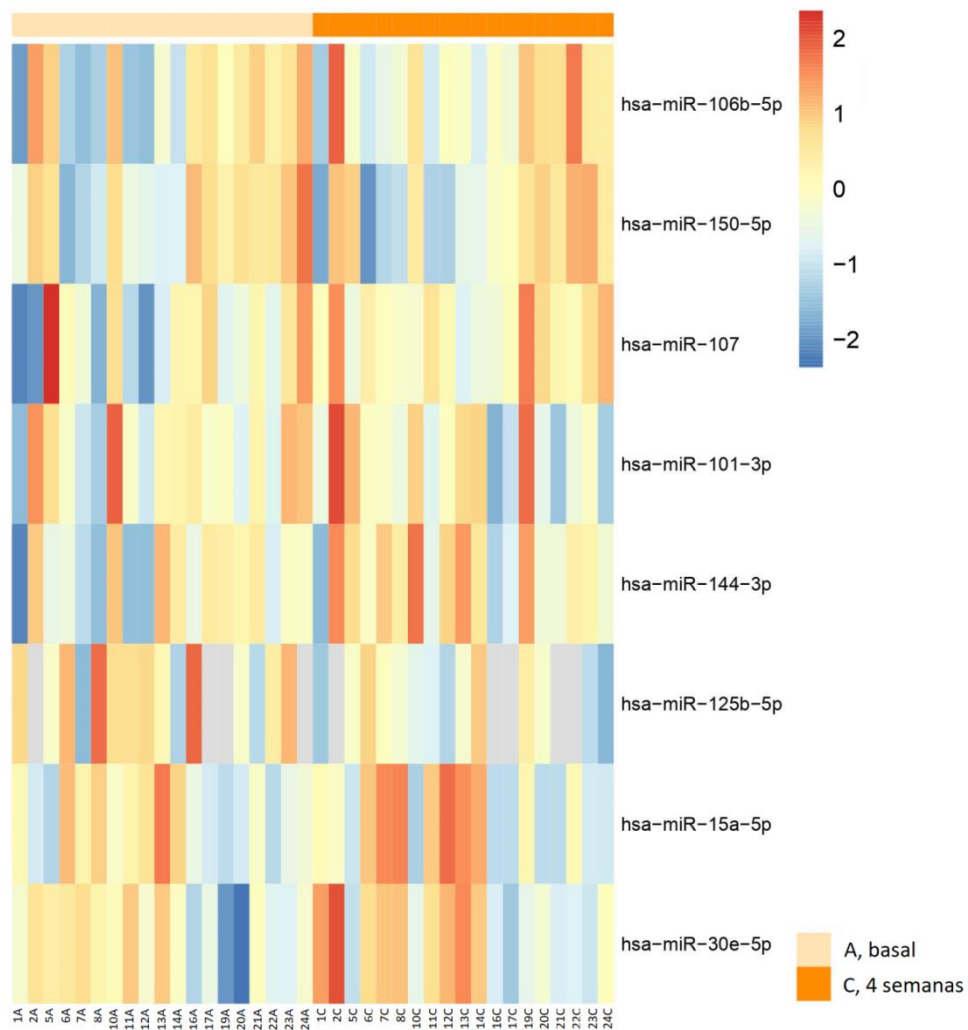


Figura 12. Diagrama do *heat map* supervisionado dos miRNA expressos no plasma com agrupamento do período basal e após 4 semanas da ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro.

4.7.4 Expressão de miRNA em PBMC

A partir dos 137 miRNA analisados em cada amostra (n = 8), foram detectados em média 96 miRNA por amostra, sendo que 80 estavam presentes em todas as amostras (Tabela 15).

Tabela 15. Número de miRNA analisados e detectados nas amostras de PBMC

	miRNA detectados
<i>miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR Custom Pick and Mix panel</i>	137
miRNA detectados em todas as amostras	80
Média de miRNA detectados por amostra	96

Dentre os miRNA detectados em PBMC, sete apresentaram alteração significativa na expressão quando comparada com o período basal, sendo que os miR-424-5p, miR-144-3p, miR-27a-3p, let-7d-5p e miR-130b-3p aumentaram a sua expressão, e apenas os miR-126-3p e let-7f-5p tiveram sua expressão reduzida (Tabela 16). A análise completa da diferença de expressão de miRNA entre o período basal e 4 semanas é apresentada em anexo (Anexo 10).

Tabela 16. *Fold change* da expressão de miRNA em PBMC que apresentaram significância 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro (n = 8).

miRNA	<i>Fold-change</i>	<i>p valor</i>
hsa-miR-424-5p	1,76	0,0002
hsa-miR-144-3p	1,72	0,003
hsa-miR-126-3p	0,61	0,004
hsa-let-7f-5p	0,61	0,005
hsa-miR-27a-3p	1,26	0,043
hsa-let-7d-5p	1,20	0,046
hsa-miR-130b-3p	1,26	0,048

Os miRNA que apresentaram diferença estatística foram analisados nas demais amostras (n = 12), incluindo o hsa-mir-142-3p (*fold-change* 1,21 e *p* = 0,072) e o hsa-miR-17-5p (*fold-change* 1,27 e *p* = 0,114), os quais estão relacionados à resposta inflamatória (XU et al., 2013; ZHU et al., 2013). Considerando ambas as análises (n = 8 e n = 12), os miR-424-5p, miR-144-3p e miR-130b-3p apresentaram expressão aumentada, e os let-7f-5p e miR-126-3p tiveram sua expressão reduzida em relação ao período basal (n = 20) (Tabela 17).

Tabela 17. *Fold change* da expressão de miRNA em PBMC 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro (n = 20).

miRNA	<i>Fold-change</i>	<i>p</i> valor
hsa-miR-424-5p	1,62	0,002
hsa-miR-144-3p	1,69	0,006
hsa-let-7f-5p	0,73	0,007
hsa-miR-130b-3p	1,27	0,031
hsa-miR-126-3p	0,70	0,044
hsa-miR-27a-3p	1,22	0,088
hsa-miR-142-3p	1,04	0,678
hsa-miR-17-5p	0,99	0,938
hsa-let-7d-5p	1,00	0,961

A localização genômica e o *cluster* previsto para os miRNA modulados em PBMC, são mostrados na tabela 18.

Tabela 18. Localização cromossômica dos miRNA modulados em PBMC após a ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro.*

miRNA	Localização cromossômica	Cluster de miRNA
hsa-miR-424-5p	Xq26.3	hsa-miR-424-5p; hsa-miR-503; hsa-miR-542; hsa-miR-450a-2; hsa-miR-450a-1; hsa-miR-450b
hsa-miR-144-3p	17q11.2	hsa-miR-144; hsa-mir-4732; hsa-mir-451b; hsa-mir-451a
hsa-let-7f-5p	9q22.32	hsa-let-7a-1, hsa-let-7f-1, hsa-let-7d

continua

Tabela 18. Localização cromossômica dos miRNA modulados em PBMC após a ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro.*

continuação

miRNA	miRNA	miRNA
hsa-miR-130b-3p	22q11.21	hsa-mir-301b; hsa-mir-130b
hsa-miR-126-3p	9q34.3	—

*Disponível em <http://www.mirbase.org/> e <https://www.genecards.org/>

O *heat map* supervisionado dos miRNA expressos em PBMC (n=20), apresentado na Figura 13, mostra que não houve nenhum padrão de expressão de miRNA, se agrupados de acordo com o momento basal e após 4 semanas de ingestão do suco.

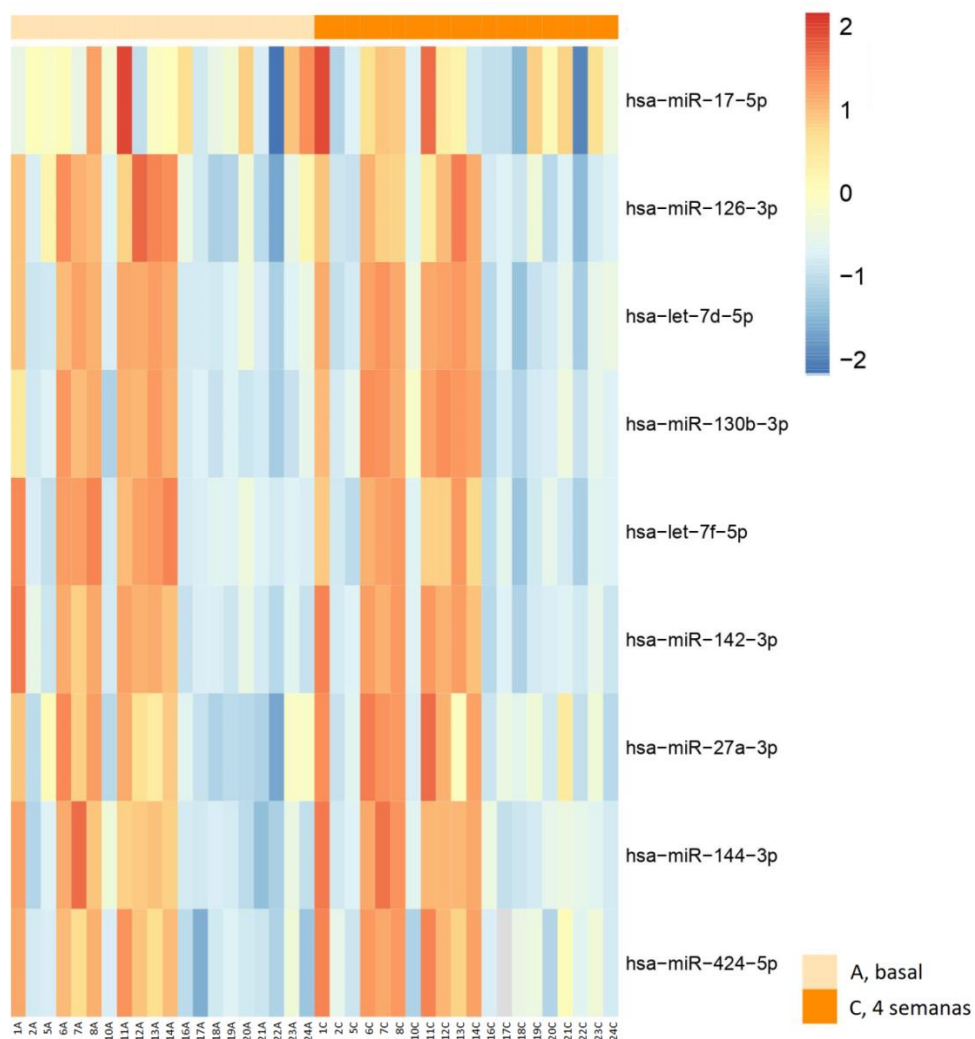


Figura 13. Diagrama do *heat map* supervisionado dos miRNA expressos em PBMC com agrupamento do período basal e após 4 semanas da ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro.

4.7.5 Predição de mRNA alvos

A tabela 19 apresenta o número de mRNA identificados no *software* IPA, para os miRNA diferencialmente expressos em PBMC após 4 semanas de ingestão do suco de laranja sanguínea Moro. Foi considerado $p < 0,05$ como nível de confiança de predição.

Tabela 19. Número de mRNA identificados na análise *in silico* como alvos experimentalmente validados, altamente preditos e moderadamente preditos

miRNA	Experimentalmente validado	Altamente predito	Moderadamente predito
hsa-miR-424-5p	202	375	1807
hsa-miR-144-3p	1	115	526
hsa-let-7f-5p	158	341	960
hsa-miR-130b-3p	10	237	862
hsa-miR-126-3p	9	31	106

Na tabela 20, é apresentado apenas o número de mRNA alvos da via de sinalização inflamatória identificados no *software* IPA, para os miRNA diferencialmente expressos em PBMC após 4 semanas de ingestão do suco de laranja sanguínea Moro. Foi considerado $p < 0,05$ como nível de confiança de predição.

Tabela 20. Número de mRNA da via de sinalização inflamatória identificados na análise *in silico* como alvos experimentalmente validados, altamente preditos e moderadamente preditos.

miRNA	Experimentalmente validado	Altamente predito	Moderadamente predito
hsa-miR-424-5p	5	4	17
hsa-miR-144-3p	-	4	4
hsa-let-7f-5p	2	6	7
hsa-miR-130b-3p	1	3	9
hsa-miR-126-3p	1	1	-

4.7.6 Análise das redes gênicas

A figura 14 mostra os alvos dos miRNA diferencialmente expressos em PBMC, obtidos por meio do *software* IPA.

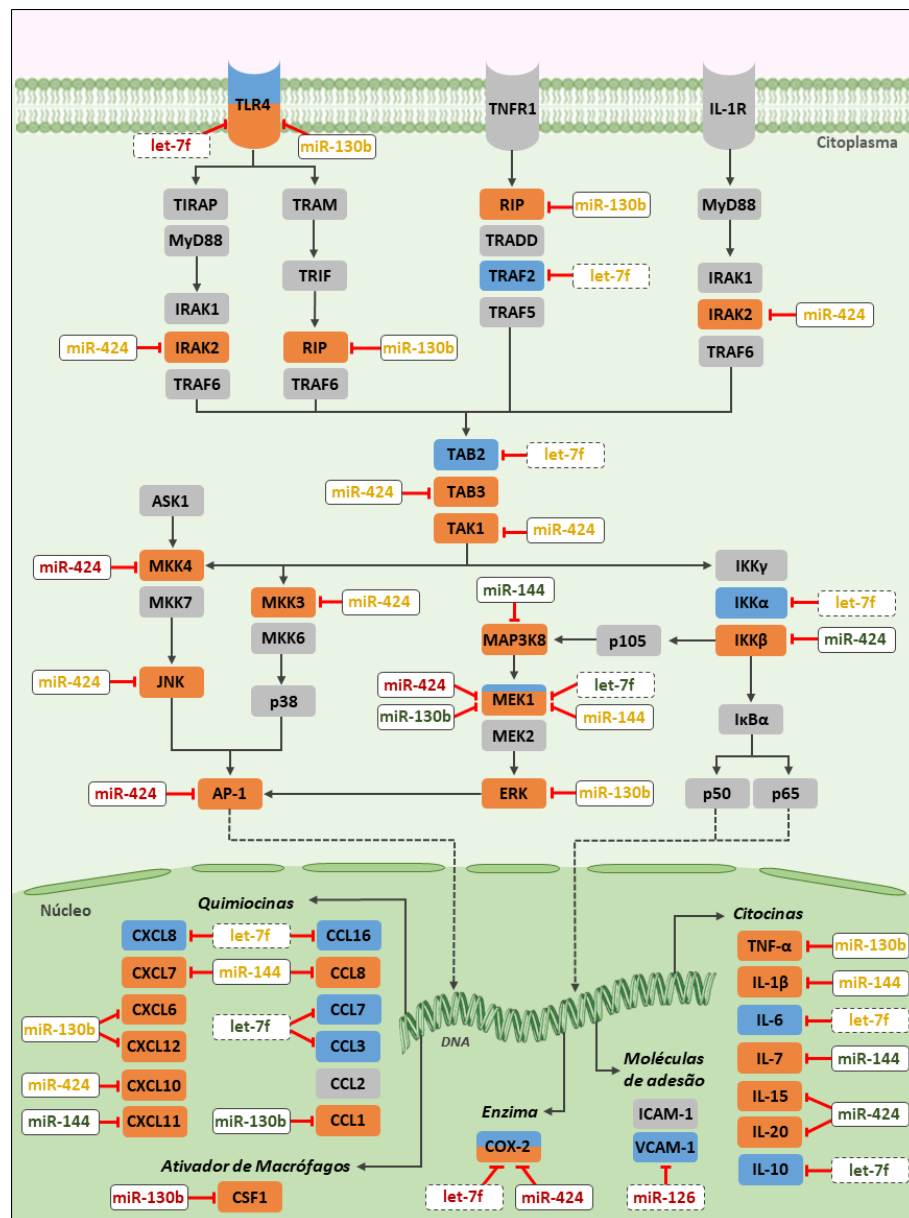


Figura 14. Alvos dos miRNA alterados em PBMC ($p < 0,05$), após ingestão diária de 500 mL de suco de laranja Moro por 4 semanas. **Legenda:** caixa laranja, proteína com possível maior silenciamento pós-transcricional; caixa azul, proteína com possível menor silenciamento pós-transcricional; caixa laranja e azul, proteína com possível maior (laranja) e menor (azul) silenciamento pós-transcricional de acordo com gradiente de coloração; caixa cinza, proteína possivelmente não modulada; caixa com contorno sólido, miRNA com expressão aumentada; caixa com contorno tracejado, miRNA com expressão diminuída; miRNA em vermelho, alvo experimentalmente validado; miRNA descrito em verde, alvo altamente predito; miRNA descrito em amarelo, alvo moderadamente predito. Alvos obtidos *in silico* no *software* IPA. Abreviações: ver lista de abreviaturas e siglas.

4.8 EFEITO DA INGESTÃO DO SUCO DE LARANJA SANGUÍNEA MORO SOBRE O CONTEÚDO E FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS

A análise do conteúdo proteico e da fosforilação de proteínas presentes em vias de sinalização inflamatória (TAK1, IKK β , JNK, I κ B α e NF- κ B) e da β -actina em PBMC é mostrada na Figura 15. A ingestão do suco de laranja sanguínea Moro aumentou a razão da fosfo-JNK/JNK ($p < 0,05$) e diminuiu o conteúdo proteico celular de NF- κ B em PBMC ($p < 0,05$).

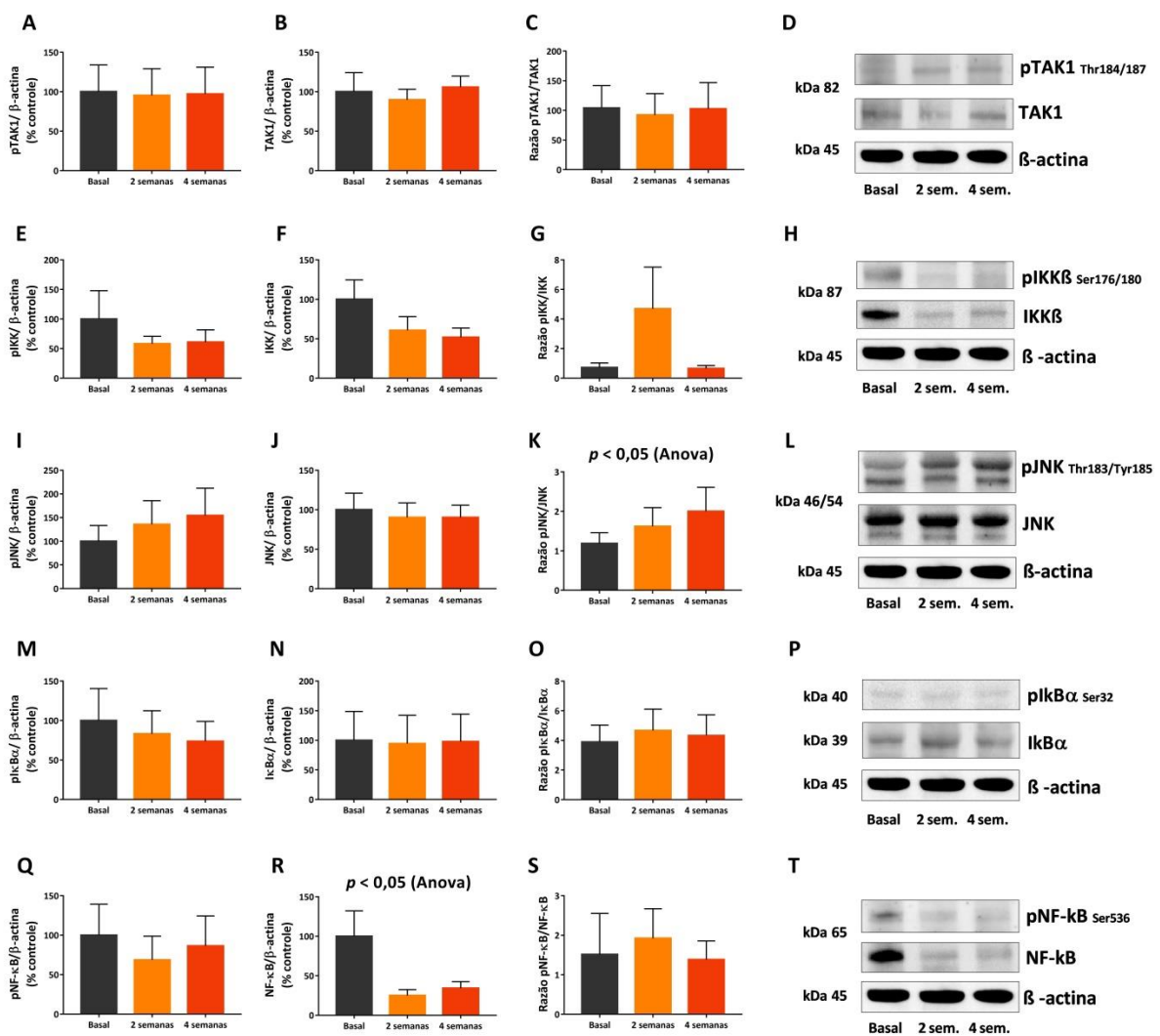


Figura 15. Efeito da ingestão de suco de laranja sanguínea Moro sobre o conteúdo e a fosforilação de proteínas da via de sinalização inflamatória. Análise quantitativa da expressão da fosfo-TAK1 (A), TAK1 (B), razão fosfo-TAK1/TAK1 (C), fosfo-IKK (E), IKK (F), razão fosfo-IKK β /IKK β (G), fosfo-JNK (I), JNK (J), razão fosfo-JNK/JNK (K), fosfo-I κ B α (M), I κ B α (N), razão fosfo-I κ B α /I κ B α (O), fosfo-NF- κ B(Q), NF- κ B (R), razão fosfo-NF- κ B/NF- κ B (S) e imagens da expressão de proteínas obtidas por *Western Blotting* (D, H, L, P, T). A expressão de proteínas foi normalizada pela expressão da β -actina. Valores são média \pm EPM, n = 12. Analisado por *One way ANOVA* com pós-teste de Tukey ou Dunn.

4.9 EFEITO DA INGESTÃO DO SUCO DE LARANJA SANGUÍNEA MORO SOBRE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS

A tabela 21 mostra a concentração plasmática de citocinas, moléculas de adesão e quimiocina nos três tempos do protocolo experimental. A ingestão do suco de laranja sanguínea Moro não alterou a concentração dos biomarcadores inflamatórios analisados. O valor de concentração identificado para cada metabólito analisado se encontra dentro da faixa de concentração proposta pela curva padrão do kit de análise.

Tabela 21. Citocinas, moléculas de adesão e quimiocina avaliadas no período basal e 2 e 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL de suco de laranja sanguínea Moro.

Parâmetro	Basal	2 semanas	4 semanas	p valor
IL-6 (pg/mL)	27,1 ± 7,8	26,6 ± 7,5	29,5 ± 9,8	0,86
IL-10 (pg/mL)	32,6 ± 4,7	31,3 ± 3,9	35,8 ± 4,7	0,34
TNF- α (pg/mL)	3,81 ± 0,42	3,75 ± 0,38	3,59 ± 0,23	0,89
sICAM (ng/mL)	341 ± 20	326 ± 18	320 ± 18	0,19
sVCAM (ng/mL)	395 ± 27	386 ± 25	374 ± 25	0,31
MCP-1 (pg/mL)	16,4 ± 1,2	15,5 ± 1,2	16,2 ± 1,1	0,71

Valores são média \pm EPM, n = 20. Analisado por *One way* ANOVA com pós-teste de Tukey ou Dunn. Abreviações: IL, interleucina; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; sICAM, molécula de adesão intercelular solúvel; sVCAM, molécula de adesão celular vascular solúvel; MCP-1, proteína quimiotática de monócitos 1, também conhecida como CCL2.

5 DISCUSSÃO

A ingestão diária de 500 mL de suco de laranja sanguínea Moro, por 4 semanas, favoreceu o aumento da ingestão de flavonoides, carotenoides e vitamina C. No tocante à avaliação de aspectos moleculares em PBMC, a intervenção nutricional em tela promoveu aumento da razão fosfo-JNK/JNK, redução do conteúdo proteico da subunidade p65 do NF- κ B, bem como modulou a expressão de miRNA envolvidos com o controle da expressão de proteínas da via de sinalização do NF- κ B e MAPK. Por outro lado, a ingestão da bebida não resultou em alterações significativas na ingestão calórica, na expressão de genes que codificam proteínas envolvidas com a resposta inflamatória em PBMC e nos parâmetros antropométricos e bioquímicos analisados ao final do protocolo experimental.

Corroborando os estudos publicados por Maccarone et al. (1985), dentre os flavonoides cítricos quantificados, o suco de laranja sanguínea Moro utilizado no presente estudo apresentou alta concentração de C3G e hesperidina, que se caracteriza como o principal flavonoide encontrado em laranjas (GATTUSO et al., 2007; GROSSO et al., 2013). Além disso, também foi verificada a presença, em menor concentração, de narirutina, cianidina-3-O-(6''-malonyl glicosídeo), didimina, naringina, naringenina e hesperitina. Desse modo, a ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro favoreceu a ingestão diária de flavonoides cítricos, os quais têm sido associados à redução do risco de desenvolvimento de resistência à ação da insulina (PU et al., 2012), doenças cardiovasculares (ALAM et al., 2013), dislipidemias (ASSINI et al., 2013) e alguns tipos de câncer (WANG LIW et al., 2014).

Durante a intervenção, as participantes ingeriram aproximadamente 291 mg/dia de flavonoides pela ingestão da bebida. Estima-se que, no Brasil, a população consuma em média 139 mg/dia de flavonoides (CORRÊA et al., 2015). Atualmente, não existe uma dose diária recomendada para a ingestão desses compostos, embora uma ingestão entre 250 e 400 mg/dia tenha sido proposta como adequada para os flavonoides totais (PELUSO e PALMERY, 2015). Em vista disso, verifica-se que a ingestão diária de 500 mL de suco de laranja sanguínea Moro, como parte da refeição habitual, durante quatro semanas, foi responsável pela adequação da ingestão de flavonoides pelas participantes do estudo. Além

disso, apenas a ingestão da bebida contribuiu com a ingestão de 2.541,5 µg/dia de carotenoides e de 237 mg/dia de vitamina C, cujo valor é significativamente superior à recomendação de ingestão diária de 75 mg de vitamina C para mulheres adultas. No entanto, a ingestão de vitamina C, por meio da ingestão da bebida associada à ingestão alimentar diária relatada, não ultrapassou o limite superior tolerável de ingestão recomendado para este grupo (2.000 mg/dia) (IOM, 2001).

De acordo com os ensaios *in vitro*, o suco de laranja sanguínea Moro apresentou importante contribuição antioxidante para as participantes. Os ensaios de ORAC e DPPH mostraram que o suco utilizado em nosso estudo proporcionou maior capacidade antioxidante quando comparado aos sucos de laranja Cara Cara e Bahia, analisados antes e após a pasteurização em um estudo prévio (BRASILI et al., 2017). A capacidade antioxidante do suco está provavelmente associada à concentração de vitamina C e de fenólicos totais presentes na bebida. Embora o suco tenha sido pasteurizado, o tratamento térmico não diminuiu a capacidade antioxidante e o conteúdo de vitamina C e de flavonoides da bebida (ALEGRE, 2015; ARENA et al., 2001).

Todas as voluntárias iniciaram o protocolo experimental com o índice HOMA-IR indicando resistência à ação da insulina. Para brasileiros adultos, com IMC inferior a 30 kg/m², foi sugerido um índice HOMA-IR superior a 2,70 como indicativo de resistência à insulina (GELONEZE et al., 2009). Embora o índice HOMA-IR não tenha diminuído significativamente após a conclusão do nosso estudo, as voluntárias apresentaram, em média, um valor de HOMA-IR (2,69 ± 0,19) inferior àquele indicado para a presença de resistência à insulina, sugerindo que a ingestão do suco de laranja sanguínea Moro possa ter efeito sobre o metabolismo glicêmico. Nesse contexto, estudo em camundongos alimentados com uma ração hiperlipídica associada com a suplementação de suco de laranja sanguínea Moro, por 12 semanas, *ad libitum*, verificou melhora da sensibilidade à insulina (SALAMONE et al., 2012).

No presente estudo, a ingestão do suco de laranja não influenciou a expressão de genes relacionados à resposta inflamatória. Corroborando esse resultado, Deopurkar et al. (2010) também não observaram alterações na expressão gênica de *TLR2*, *TLR4* e *SOCS3* em PBMC, de adultos saudáveis, 5 horas após a ingestão de 300 mL de suco de laranja. Por outro lado, a ingestão do suco por um período superior pode levar a alterações significantes

na expressão de mRNA. Nesse sentido, camundongos que receberam suco de laranja sanguínea, por um período de 15 semanas, apresentaram diminuição da expressão gênica de receptores hepáticos X alfa (*LXR-A*) e aumento da expressão gênica do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (*PPARA*), o que resultou em redução da lipogênese e da esteatose hepática, respectivamente (SALAMONE et al., 2012).

Em contrapartida, a ingestão da bebida foi capaz de modular a expressão de miRNA no plasma e em PBMC. Os miRNA diferencialmente expressos estão localizados em diferentes regiões genômicas, ou seja, nenhum dos miRNA modulados são encontrados no mesmo *cluster* de miRNA. Estudos evidenciam que diferentes nutrientes e compostos bioativos presentes em alimentos podem regular a biogênese de miRNA (CHOI e FRISO, 2010; TIFFON, 2018; QUINTANILHA et al., 2020). De modo geral, os componentes dietéticos também podem modular a expressão de miRNA por meio de alterações epigenéticas, como a metilação do DNA e a modificação de histonas (CHOI e FRISO, 2010; TIFFON, 2018). De forma mais específica, dentre alguns dos compostos presentes na laranja sanguínea Moro, a didimina foi relacionada à atenuação da atividade do fator de transcrição N-Myc, responsável por inibir a expressão do let-7 (SINGHAL et al., 2017); e a ingestão dos carotenoides, luteína e zeaxantina, foi associada à regulação da atividade da DICER (KIM et al., 2019).

No plasma, a ingestão do suco de laranja sanguínea Moro aumentou a expressão do miR-144-3p, um miRNA amplamente expresso em tecidos humanos e fluidos corporais, sendo abundante em eritrócitos (SUN et al., 2020). A elevada concentração plasmática de miR-144 pode sugerir um aumento no processo de hemólise. Todavia, nesse processo, ambas as fitas 3p (passageira) e 5p (guia) estariam aumentadas no plasma, e não apenas a isoforma 3p, conforme verificado em nosso estudo. Esse resultado indica que a ingestão do suco de laranja foi responsável por aumentar apenas a concentração plasmática de miR-144-3p e que não ocorreu hemólise nas amostras experimentalmente testadas, corroborando a análise de hemólise previamente apresentada.

A expressão plasmática do miR-144 não é indicada como biomarcador para a inflamação. Por outro lado, diferentes estudos mostraram que a expressão desse miRNA no plasma e tecidos corporais está alterada em doenças como o DM2 (ZHU e LEUNG, 2015). Nesse sentido, a expressão plasmática de miR-144 tem sido proposta como biomarcador

para o DM2 (ZHU e LEUNG, 2015; LIANG et al., 2018). Contudo, na literatura científica há resultados divergentes sobre a expressão plasmática do miR-144 em indivíduos com DM2. Por exemplo, em um estudo com indivíduos diabéticos, a elevada expressão de miR-144 no plasma foi associada ao DM2 em suecos, mas não em iraquianos (WANG XIA et al., 2014). Em pacientes diabéticos com disfunção cardíaca, a expressão do miR-144 no plasma foi encontrada acentuadamente diminuída e o aumento da concentração plasmática de miR-144 — por meio da administração de miR-144 mimic (agomiR) — em camundongos tratados com estreptozotocina para indução de diabetes, protegeu o coração de lesões induzidas pela hiperglicemia e promoveu biogênese mitocondrial cardíaca (TAO et al., 2020).

Em PBMC, o miR-144-3p também apresentou o maior *fold change* em relação aos demais miRNA diferencialmente expressos decorrente da ingestão do suco de laranja sanguínea Moro. Embora a análise *in silico* não tenha apontado nenhum mRNA alvo experimentalmente validado para o miR-144 na via de sinalização inflamatória, Han et al. (2018) mostraram, por meio do ensaio de luciferase, que o miR-144 controla a expressão do CXCL11 por meio da sua ligação à região 3'UTR de seu mRNA. Por outro lado, de acordo com o *software* IPA, o miR-144 tem como alvo altamente predito os mRNA que codificam as proteínas MAP3K8, IL-7, CXCL11 e o membro da superfamília do TNF (TNFSF)-11, além de interagir, de forma moderada, com outros alvos da via do fator de transcrição NF- κ B e da MAPK. O TNFSF11 é responsável pela ativação da via de sinalização inflamatória com aumento da expressão de citocinas pro-inflamatórias, sendo fundamental na regulação do recrutamento e ativação dos osteoclastos na artrite reumatoide (HAUGEBERG et al., 2003). O miR-144 mostrou exercer efeito na modulação da resposta inflamatória por meio da redução da expressão do TNFSF11, o que resultou na diminuição da expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-23 em células dendríticas e IL-17 em células Th17 (LI RUI et al., 2018).

A expressão de miR-424-5p, em PBMC, também foi aumentada após a ingestão do suco de laranja. Dentre os miRNA diferencialmente expressos no final do protocolo experimental, o miR-424 é o que apresenta o maior número de alvos experimentalmente validados no *software* IPA, sendo indicado os mRNA que codificam as proteínas MEK1, MKK4, AP-1, COX-2 e TNFSF9. O miR-424 ainda tem, como alvos altamente preditos, os mRNA que codificam as proteínas IKK β , IL-20 e IL-15, além de poder se ligar de forma moderada com outros alvos da via do NF- κ B e da MAPK.

O miR-424 pode estar indiretamente relacionado ao controle da fosforilação de proteínas intracelulares. A análise *in silico* no *software* IPA mostrou que a proteína fosfatase 2A (PP2A) é um alvo experimentalmente validado do miR-424. A PP2A é uma enzima responsável por controlar a fosforilação de diversas proteínas intracelulares, incluindo os componentes da via do NF- κ B e da MAPK, dentre os quais a PP2A pode desfosforilar a JNK (CLARK e OHLMEYER, 2019). Desse modo, o aumento da expressão do miR-424 pode reduzir o conteúdo de PP2A e, conseqüentemente, influenciar em vias de sinalização nas quais a PP2A atua por meio de mecanismo de desfosforilação proteica.

Em nosso estudo, a ingestão do suco de laranja sanguínea Moro não aumentou a fosforilação de JNK em relação ao controle, todavia quando avaliamos a razão fosfo-JNK/JNK, verificamos aumento da proporção de fosfo-JNK em relação ou conteúdo de JNK intracelular. Embora a fosforilação de JNK esteja relacionada ao aumento da expressão de genes inflamatórios, morte celular e inibição da via de sinalização da insulina, a fosforilação de JNK também é responsável por ocasionar ativação do fator de transcrição designado NRF2, o qual modula a expressão gênica de enzimas antioxidantes (SU et al., 2015; HU et al., 2017). *In vitro*, o tratamento de hepatócitos e neurônios com as flavanonas cítricas neosperidina (10 a 30 μ M) e hesperitina (50 μ M), respectivamente, resultou no aumento da fosforilação de JNK, sem diminuir a viabilidade celular (HWANG e YEN, 2009; SU et al., 2015). Além disso, o pré-tratamento de macrófagos com luteína (10 μ M) não reduziu a fosforilação de JNK induzida por LPS, ainda que tenha resultado na diminuição do estímulo inflamatório por meio do bloqueio da fosforilação induzida por LPS das quinases ERK e p38 e da liberação de TNF- α (XAGORARI et al., 2002). Portanto, é possível que o aumento da proporção de JNK fosforilada em PBMC, devido à ingestão do suco de laranja, não esteja relacionado ao aumento do estímulo inflamatório ou ao desenvolvimento da resistência à insulina, mas sinalize um dos possíveis mecanismos pelo qual a laranja sanguínea Moro desempenha proteção antioxidante ao organismo.

A ingestão da bebida ainda aumentou a expressão do miR-130b-3p em PBMC. A análise *in silico* indicou o fator estimulador de colônia 1 (CSF1) como alvo experimentalmente validado e MEK1, CCL1 e o receptor de IL10 (IL10RB) como alvos altamente preditos do miR-130b, além de outros alvos da via de sinalização inflamatória, com os quais esse miRNA pode se ligar de forma moderada. Somado a isso, alguns alvos do

miR-130b também foram experimentalmente validados em estudos que avaliaram componentes da via de sinalização inflamatória. Wang et al. (2017) mostraram que o aumento da expressão de miR-130b atenuou a inflamação aguda no pulmão de camundongos induzida pela administração de LPS, por meio da ligação do miR-130b à região 3'UTR do mRNA da MAP3K8 e consequente diminuição da expressão de TNF- α , IL-6 e E-selectina, o que resultou em proteção do endotélio vascular pulmonar. Guo et al. (2021) mostraram que o miR-130b-3p também inibiu a polarização de macrófagos M1 por meio da inibição do fator regulador de interferon 1 (IRF1), com consequente redução da expressão dos genes CCL5, CXCL10, enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e TNF.

A expressão de miRNA também foi negativamente regulada pela suplementação com o suco de laranja sanguínea Moro. Ao final do protocolo experimental, foi verificada diminuição da expressão do let-7f-5p em PBMC. De acordo com o *software* IPA, o let-7f tem como alvo experimentalmente validado TLR4 e COX-2 e como alvo altamente predito MEK1, IL-10, CCL3, -7, TNFSF9 e -10, além de se ligar de forma moderada com outros alvos da via do NF- κ B e da MAPK. Dentre os alvos indicados, analisamos apenas a concentração plasmática de IL-10, que não apresentou alteração após a ingestão da bebida, sugerindo que a diminuição da expressão de let-7f-5p não afetou a expressão de IL-10. Por outro lado, a redução da expressão de let-7f-5p em células dependentes de insulina pode ser benéfica em DM2, por favorecer a sinalização intracelular de insulina, uma vez que o let-7f tem como alvos: receptor de insulina (INSR); receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1R); IRS-2; proteína 1 de interação da fosfatidilinositol 3 quinase (PIK3IP1); e proteína quinase B/Akt 2 (Akt2) (ZHU HAO et al., 2011).

A expressão dos clusters de let-7 foi identificada como importante fator no controle da expressão de IL-6. Os let-7adf participam de mecanismos relacionados à secreção de IL-6 por macrófagos ativados com LPS e TNF- α , por meio da regulação negativa da metilcitosina dioxigenase 2 (Tet2), uma enzima nuclear responsável por diminuir a metilação do DNA. Por outro lado, a inibição da expressão de let-7 aumentou a expressão de Tet2 e diminuiu a expressão gênica e o conteúdo de IL-6 em macrófagos. Todavia, é desconhecido como essa alteração na metilação pode controlar a expressão de IL-6 (JIANG et al., 2019). Nesse sentido, aventa-se que a vitamina C pode colaborar com o controle da expressão de IL-6, uma vez que esse micronutriente foi associado à indução da atividade de Tet2 (LINDSEY et

al., 2019). Nesse sentido, a vitamina C e a diminuição da expressão de let-7f podem exercer um efeito anti-inflamatório, ainda que não tenha sido observada alteração na concentração plasmática de IL-6, que, ao longo do nosso protocolo experimental, se manteve abaixo do valor encontrado em indivíduos com sobrepeso, nos quais a concentração plasmática de IL-6 foi em média 80 pg/mL (EL-MIKKAWY et al., 2020).

A família do let-7 também está relacionada ao controle da via do NF- κ B. O aumento da expressão de let-7f foi relacionado ao aumento da ativação da via de sinalização do NF- κ B, com maior translocação do p65 para o núcleo celular (KUMAR et al., 2015). Além disso, Zhou et al. (2019) demonstraram que o let-7g se liga à região 3'UTR do homeobox B1 (HOXB1), um regulador transcricional envolvido com a atenuação da expressão de p50 e p65. Os pesquisadores mostraram que a inibição de let-7g aumentou o HOXB1 em nível de mRNA e de proteína, o que coincidiu com a diminuição da expressão de p50 e p65, também em nível de mRNA e de proteína. Entretanto, não foi determinado o mecanismo pelo qual o HOXB1 pode inibir a expressão dessas subunidades de NF- κ B.

Em nosso estudo, verificamos redução do conteúdo proteico de p65 associada à ingestão do suco de laranja sanguínea Moro. A análise *in silico* no *software* IPA indicou que o HOXB1 é alvo altamente predito de let-7f-5p e 130b-3p. Esses resultados indicam que a ingestão do suco de laranja foi capaz de modular a expressão de miRNA responsáveis por controlar indiretamente a expressão de p50 e p65. Isso pode justificar, em parte, a diminuição do conteúdo proteico de p65, uma vez que a expressão de let-7f foi reduzida, sugerindo maior expressão do HOXB1 e, conseqüentemente, menor expressão de p65. Por outro lado, em nosso estudo, não verificamos redução dos níveis de mRNA do p65, indicando apenas um controle pós-transcricional no nível dessa proteína. Sirotkin et al. (2015) mostraram que os principais inibidores pós-transcricionais da expressão do p65 são miR-1, miR-27a e miR-150. Em nosso estudo, apenas o miR-27a foi analisado em todas as amostras, mas não apresentou aumento significativo da expressão (*fold-change* 1,22 e $p = 0,09$) após a ingestão do suco de laranja. Desse modo, é desconhecido o mecanismo pelo qual a ingestão regular do suco de laranja sanguínea Moro reduziu o conteúdo intracelular de p65 em PBMC.

O miR-126-3p também apresentou menor expressão em PBMC ao final do protocolo experimental. A análise *in silico* no *software* IPA indicou que o miR-126 tem como alvo

experimentalmente validado apenas a VCAM-1 e como alvo altamente predito o membro 10b da superfamília de receptores do TNF (TNFRSF10B), um receptor que contém um domínio de morte intracelular e está relacionado à ativação da apoptose (NAIR et al., 2014). Em nossas análises, a concentração plasmática de VCAM-1 não apresentou alteração após a ingestão da bebida, sugerindo que a diminuição da expressão de miR-126-3p pode não ter afetado a expressão de VCAM-1. Por outro lado, YU et al. (2018) mostraram que a inibição do miR-126, em condrócitos, reduziu a inflamação induzida por IL-1 β e aumentou o conteúdo proteico do regulador de apoptose Bcl-2 (Bcl-2), por meio da inativação das vias de sinalização p38 e JNK, com consequente diminuição do conteúdo de IL-6, IL-8 e TNF- α . Além disso, a redução da expressão de miR-126 em células dependentes de insulina pode ser benéfica em DM2, por favorecer a sinalização intracelular de insulina, uma vez que o miR-126 tem como alvo IRS-1 (FANG et al., 2017) e IRS-2 (TAO et al., 2016).

Tendo em vista os aspectos observados, entende-se que a modulação dos miRNA supramencionados pode atenuar a resposta inflamatória por meio do controle pós-transcricional de proteínas da via de sinalização do NF- κ B e da MAPK e, indiretamente, por meio do controle de fatores de transcrição e enzimas que podem controlar a expressão e a atividade de componentes específicos dessa via de sinalização. Embora não tenha sido observada alteração na concentração plasmática dos biomarcadores inflamatórios analisados, os resultados supramencionados sugerem que as alterações observadas em nível molecular podem fazer parte dos efeitos iniciais sobre o controle da via de sinalização do NF- κ B e MAPK, proporcionados pela ingestão regular do suco de laranja sanguínea Moro.

Novos estudos são necessários para elucidar se um período maior de suplementação pode influenciar positivamente os efeitos moleculares observados em PBMC. Além disso, embora tenhamos verificado que a ingestão da bebida tenha diminuído o conteúdo de p65, são necessários estudos que identifiquem os mecanismos moleculares responsáveis por essa modulação. Seguramente, isso reforçará o uso da laranja sanguínea Moro em terapias nutricionais e até mesmo na padronização de extratos e formulações farmacêuticas, que poderão auxiliar na redução do risco e tratamento de DCNT. Portanto, embora o estudo tenha gerado novas perguntas a serem investigadas, é seguro afirmar que, não havendo contraindicações, a ingestão do suco de laranja sanguínea Moro pode ser associada à promoção da saúde.

6 CONCLUSÃO

A ingestão do suco de laranja sanguínea Moro modula a expressão de miRNA envolvidos na regulação da resposta inflamatória em PBMC e no plasma e diminui o conteúdo proteico da subunidade p65 do NF- κ B em PBMC, sem alterar a ingestão calórica, os parâmetros antropométricos e os biomarcadores metabólicos avaliados.

REFERÊNCIA

- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 16 ed. AOAC International: Arlington, VA, EUA: 1995.
- AKIYAMA, S. et al. Dietary Hesperidin Exerts Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects in Streptozotocin-Induced Marginal Type 1 Diabetic Rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 46, n. 1, p. 87–92, 2009.
- ALAM, M. A.; KAUTER, K.; BROWN, L. Naringin improves diet-induced cardiovascular dysfunction and obesity in high carbohydrate, high fat diet-fed rats. **Nutrients**, v. 5, n. 3, p. 637–650, 2013.
- ALEGRE, G. F. S. **Determinação de compostos bioativos e capacidade antioxidante em sucos frescos e pasteurizados de laranja**. Dissertação (mestrado)—[s.l.] Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2015.
- AMERES, S. L.; ZAMORE, P. D. Diversifying microRNA sequence and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 8, p. 475–488, 2013.
- ARENA, E.; FALLICO, B.; MACCARONE, E. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. **Food Chemistry**, v. 74, n. 4, p. 423–427, 2001.
- ASSINI, J. M.; MULVIHILL, E. E.; HUFF, M. W. Citrus flavonoids and lipid metabolism: **Current Opinion in Lipidology**, v. 24, n. 1, p. 34–40, 2013.
- AZZINI, E. et al. Effect of Red Orange Juice Consumption on Body Composition and Nutritional Status in Overweight/Obese Female: A Pilot Study. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–9, 2017.
- BARTEL, D. P. MicroRNA: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.
- BAS, S. et al. CD14 is an acute-phase protein. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 172, n. 7, p. 4470–4479, 2004.
- BECKETT, E. L. et al. The role of vitamins and minerals in modulating the expression of microRNA. **Nutrition Research Reviews**, v. 27, n. 01, p. 94–106, 2014.
- BHASWANT, M. et al. Cyanidin 3-glucoside improves diet-induced metabolic syndrome in rats. **Pharmacological Research**, v. 102, p. 208–217, 2015.
- BJØRBAEK, C. et al. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 42, p. 30059–30065, 1999.
- 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.

BOESCH-SAADATMANDI, C. et al. Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 3, p. 293–299, 2011.

BOESCH-SAADATMANDI, C. et al. Effect of quercetin on inflammatory gene expression in mice liver in vivo – role of redox factor 1, miRNA-122 and miRNA-125b. **Pharmacological Research**, v. 65, n. 5, p. 523–530, 2012.

BOUTAGY, N. E. et al. Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? **Biochimie**, v. 124, p. 11–20, 2016.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Vigitel Brasil 2016 vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Vigitel Brasil 2019 vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.

BRASIL, E. et al. Effect of Pasteurization on Flavonoids and Carotenoids in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. 'Cara Cara' and 'Bahia' Juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 7, p. 1371–1377, 2017.

BURTON-FREEMAN, B. Postprandial metabolic events and fruit-derived phenolics: a review of the science. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. S3, p. S1–S14, 2010.

BUTELLI, E. et al. Retrotransposons Control Fruit-Specific, Cold-Dependent Accumulation of Anthocyanins in Blood Oranges. **The Plant Cell**, v. 24, n. 3, p. 1242–1255, 2012.

CANI, P. D. et al. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1470–1481, 2008.

CANI, P. D. et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1761–1772, 2007.

CÁRCAMO, J. M. et al. Vitamin C suppresses TNF alpha-induced NF kappa B activation by inhibiting I kappa B alpha phosphorylation. **Biochemistry**, v. 41, n. 43, p. 12995–3002, 2002.

CARDILE, V.; GRAZIANO, A. C. E.; VENDITTI, A. Clinical evaluation of Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) orange juice supplementation for the weight management. **Natural Product Research**, v. 29, n. 23, p. 2256–2260, 2015.

CARMO, M. C. L. DO; DANTAS, M. I. DE S.; RIBEIRO, S. M. R. Caracterização do mercado consumidor de sucos prontos para o consumo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 4, p. 305–309, 2014.

CARMONA, L. et al. Anthocyanin biosynthesis and accumulation in blood oranges during postharvest storage at different low temperatures. **Food Chemistry**, v. 237, p. 7–14, 2017.

CEBADERA-MIRANDA, L. et al. Sanguinello and Tarocco (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck): Bioactive compounds and colour appearance of blood oranges. **Food Chemistry**, v. 270, p. 395–402, 2019.

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. Volume 8, p. 75–88, 2017.

CHEN, D.; FARWELL, M. A.; ZHANG, B. MicroRNA as a new player in the cell cycle. **Journal of Cellular Physiology**, v. 225, n. 2, p. 296–301, 2010.

CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*. **J Agric Food Chem**, v. 60, n. 23, p. 5884–5892, 2012.

CHOI, S. W.; FRISO, S. Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. **Advances in Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 8–16, 2010.

CHRIST, A.; LAUTERBACH, M.; LATZ, E. Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. **Immunity**, v. 51, n. 5, p. 794–811, 2019.

CLARK, A. R.; OHLMEYER, M. Protein phosphatase 2A as a therapeutic target in inflammation and neurodegeneration. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 201, p. 181–201, 2019.

CLEMENTE-POSTIGO, M. et al. Endotoxin increase after fat overload is related to postprandial hypertriglyceridemia in morbidly obese patients. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 5, p. 973–978, 2012.

COCATE, P. G. et al. Fruit and vegetable intake and related nutrients are associated with oxidative stress markers in middle-aged men. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 30, n. 6, p. 660–665, 2014.

COMINETTI, C.; HORST, M. A.; ROGERO, M. M. Brazilian Society for Food and Nutrition position statement: nutrigenetic tests. **Nutrire**, v. 42, n. 1, 2017.

CORRÊA, V. G. et al. Estimate of consumption of phenolic compounds by Brazilian population. **Revista de Nutrição**, v. 28, n. 2, p. 185–196, 2015.

CROWE-WHITE, K. et al. Metabolic impact of 100% fruit juice consumption on antioxidant/oxidant status and lipid profiles of adults: An Evidence-Based review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 1, p. 152–162, 2017.

CURTI, V. et al. Enantioselective Modulatory Effects of Naringenin Enantiomers on the Expression Levels of miR-17-3p Involved in Endogenous Antioxidant Defenses. **Nutrients**, v. 9, n. 3, p. 215, 2017.

DE MELLO, V. D. 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**, v. 56, n. 7, p. 1160-72, 2012.

DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5062-72, 2007.

DELZENNE, N. M.; CANI, P. D. Gut Microbiota and the Pathogenesis of Insulin Resistance. **Current Diabetes Reports**, v. 11, n. 3, p. 154–159, 2011.

DEOPURKAR, R. et al. Differential effects of cream, glucose, and orange juice on inflammation, endotoxin, and the expression of Toll-like receptor-4 and suppressor of cytokine signaling-3. **Diabetes Care**, v. 33, n. 5, p. 991-7, 2010.

DESGAGNÉ, V. et al. Variations in HDL-carried miR-223 and miR-135a concentrations after consumption of dietary trans fat are associated with changes in blood lipid and inflammatory markers in healthy men - an exploratory study. **Epigenetics**, v. 11, n. 6, p. 438–448, 2016.

DEVARAJ, S.; SINGH, U.; JIALAL, I. Human C-reactive protein and the metabolic syndrome: **Current Opinion in Lipidology**, v. 20, n. 3, p. 182–189, 2009.

EL-MIKKAWY, D. M. E. et al. Circulating level of interleukin-6 in relation to body mass indices and lipid profile in Egyptian adults with overweight and obesity. **Egyptian Rheumatology and Rehabilitation**, v. 47, n. 7, 2020.

EL-MOGY, M. et al. Diversity and signature of small RNA in different bodily fluids using next generation sequencing. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 408, 2018.

FAN, J.; LI, J.; FAN, Q. Naringin promotes differentiation of bone marrow stem cells into osteoblasts by upregulating the expression levels of microRNA-20a and downregulating the expression levels of PPAR γ . **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 3, p. 4759–4765, 2015.

FANG, S. et al. MicroRNA-126 inhibits cell viability and invasion in a diabetic retinopathy model via targeting IRS-1. **Oncology Letters**, v. 14, n. 4, p. 4311-4318, 2017.

FAO. **Banana market review**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia, 2020.

FOGLI-CAWLEY, J. J. et al. The 2005 Dietary Guidelines for Americans and risk of the metabolic syndrome. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, n. 4, p. 1193–1201, 2007.

FOLEY, N. H.; O'NEILL, L. A. miR-107: a toll-like receptor-regulated miRNA dysregulated in obesity and type II diabetes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 3, p. 521-7, 2012.

FREDE, K. et al. Lutein Activates the Transcription Factor Nrf2 in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 29, p. 5944-5952, 2017.

- FRIEDMAN, R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNA. **Genome Research**, v. 19, n. 1, p. 92–105, 2008.
- FUNG, T. T. et al. Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 1, p. 61–67, 2001.
- GANTKE, T. et al. I κ B kinase regulation of the TPL-2/ERK MAPK pathway. **Immunological Reviews**, v. 246, n. 1, p. 168-82, 2012.
- GATTUSO, G. et al. Flavonoid composition of Citrus juices. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 8, p. 1641–1673, 2007.
- GAVRILAS, L. et al. The Role of Bioactive Dietary Components in Modulating miRNA Expression in Colorectal Cancer. **Nutrients**, v. 8, n. 10, p. 590, 2016.
- GAZON, H. et al. Hijacking of the AP-1 Signaling Pathway during Development of ATL. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2686, 2017.
- GELONEZE, B. et al. HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome: Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 2, p. 281-7, 2009.
- GHANIM, H. et al. Increase in Plasma Endotoxin Concentrations and the Expression of Toll-Like Receptors and Suppressor of Cytokine Signaling-3 in Mononuclear Cells After a High-Fat, High-Carbohydrate Meal: Implications for insulin resistance. **Diabetes Care**, v. 32, n. 12, p. 2281–2287, 2009.
- 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.
- GHOSHAL, S. et al. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. 1, p. 90–97, 2009.
- GILLAND, K. E.; FOX, E. A. Effect of food deprivation or short-term Western diet feeding on BDNF protein expression in the hypothalamic arcuate, paraventricular, and ventromedial nuclei. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 312, n. 4, p. R611–R625, 2017.
- 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, 2002.
- GONZÁLEZ, S. et al. Dietary intake of polyphenols and major food sources in an institutionalised elderly population. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 27, n. 2, p. 176–183, 2014.

- GROSSO, G. et al. Red Orange: Experimental Models and Epidemiological Evidence of Its Benefits on Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1–11, 2013.
- GRUBE, B. J. et al. Lipopolysaccharide binding protein expression in primary human hepatocytes and HepG2 hepatoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8477–8482, 1994.
- GUO, Q. et al. miR-130b-3p regulates M1 macrophage polarization via targeting IRF1. **Journal of Cellular Physiology**, v. 236, n. 3, p. 2008–2022, 2021.
- HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 509–524, 2014.
- HALL, P.; CASH, J. What is the real function of the liver 'function' tests? **Ulster Medical Journal**, v. 81, n. 1, p. 30–6, 2012.
- HAN, B. et al. MicroRNA-144 mediates chronic inflammation and tumorigenesis in colorectal cancer progression via regulating C-X-C motif chemokine ligand 11. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 16, n. 3, p. 1935–1943, 2018.
- HAUGEBERG, G.; ØRSTAVIK, R. E.; KVIEN, T. K. Effects of rheumatoid arthritis on bone. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 15, n. 4, p. 469–75, 2003.
- HEIDEMANN, C. et al. Dietary Patterns and Risk of Mortality From Cardiovascular Disease, Cancer, and All Causes in a Prospective Cohort of Women. **Circulation**, v. 118, n. 3, p. 230–237, 2008.
- HERMSDORFF, H. H. M. et al. Vitamin C and fibre consumption from fruits and vegetables improves oxidative stress markers in healthy young adults. **The British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 8, p. 1119–1127, 2012.
- HEUMANN, D.; ROGER, T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. **Clinica Chimica Acta**, v. 323, n. 1–2, p. 59–72, 2002.
- HODGKINSON, C. P.; PATEL, K.; YE, S. Functional Toll-like receptor 4 mutations modulate the response to fibrinogen. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 100, n. 2, p. 301–307, 2008.
- HOLT, E. M. et al. Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, n. 3, p. 414–421, 2009.
- HOSSEINAHLI, N. et al. Treating cancer with microRNA replacement therapy: A literature review. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 8, p. 5574–5588, 2018.
- HOTAMISLIGIL, G. K. S. et al. IRS-1-Mediated Inhibition of Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity in TNF-alpha- and Obesity-Induced Insulin Resistance. **Science**, v. 271, n. 5249, p. 665–670, 1996.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–867, 2006.

HU, Y. R. et al. Activation of Akt and JNK/Nrf2/NQO1 pathway contributes to the protective effect of coptisine against AAPH-induced oxidative stress. **Biomed Pharmacother**, v. 85, p. 313-322, 2017.

HWANG, S. L.; YEN, G. C. Modulation of Akt, JNK, and p38 activation is involved in citrus flavonoid-mediated cytoprotection of PC12 cells challenged by hydrogen peroxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2576-82, 2009.

HYSON, D. A. A Review and Critical Analysis of the Scientific Literature Related to 100% Fruit Juice and Human Health. **Advances in Nutrition**, v. 6, n. 1, p. 37–51, 2015.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **PAM 2017: valor da produção agrícola nacional cai 0,6% após sete anos de alta**. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/pt/agencia-home.html>>. Acesso em: 20 set. 2018.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agropecuária 2020**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/>>. Acesso em: 02 abr. 2021.

IOM. **Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids**. Institute of Medicine. Washington (DC): National Academies Press (US), 2001.

IOM. **DRI Dietary Reference Intakes: Applications in Dietary Assessment**. Washington (DC): National Academies Press (US), 2002.

JAIME, P. C.; MONTEIRO, C. A. Fruit and vegetable intake by Brazilian adults, 2003. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. suppl 1, p. S19–S24, 2005.

JIANG, S. et al. Dual mechanisms of posttranscriptional regulation of Tet2 by Let-7 microRNA in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 25, p. 12416-12421, 2019.

KAFKAS, E. et al. Chemical composition of blood orange varieties from Turkey: A comparative study. **Pharmacognosy Magazine**, v. 5, n. 20, p. 329, 2009.

KAUR, J. et al. Intestinal alkaline phosphatase secretion in oil-fed rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, n. 3, p 665-70, 2007.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–384, 2010.

KHOO, H. E. et al. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food & Nutrition Research**, v. 61, n. 1, p. 1361779, 2017.

KIM, J. et al. Dietary Lutein Plus Zeaxanthin Intake and DICER1 rs3742330 A > G Polymorphism Relative to Colorectal Cancer Risk. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3406, 2019.

KIM, S. M. et al. Consumption of high-dose vitamin C (1250 mg per day) enhances functional and structural properties of serum lipoprotein to improve anti-oxidant, anti-atherosclerotic, and anti-aging effects via regulation of anti-inflammatory microRNA. **Food & Function**, v. 6, n. 11, p. 3604–3612, 2015.

KIM, Y. K.; KIM, B.; KIM, V. N. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 13, p. E1881-1889, 2016.

KIMOKOTI, R. W.; MILLEN, B. E. Nutrition for the Prevention of Chronic Diseases. **Medical Clinics of North America**, v. 100, n. 6, p. 1185–1198, 2016.

KONSTANTINIDOU, V.; RUIZ, L. A. D.; ORDOVÁS, J. M. Personalized Nutrition and Cardiovascular Disease Prevention: From Framingham to PREDIMED. **Advances in Nutrition**, v. 5, n. 3, p. 368S-371S, 2014.

KUMAR, M. et al. MicroRNA let-7 modulates the immune response to Mycobacterium tuberculosis infection via control of A20, an inhibitor of the NF- κ B pathway. **Cell Host & Microbe**, v. 17, n. 3, p. 345-356, 2015.

LANCASTER, G. I. et al. Evidence that TLR4 Is Not a Receptor for Saturated Fatty Acids but Mediates Lipid-Induced Inflammation by Reprogramming Macrophage Metabolism. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 5, p. 1096-1110.e5, 2018.

LANDI, M.; TATTINI, M.; GOULD, K. S. Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 119, p. 4–17, 2015.

LATADO, R. R. et al. Acúmulo de antocianinas e características físicas e químicas de frutos de laranjas sanguíneas durante o armazenamento a frio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 604–610, 2008.

LAUGERETTE, F. et al. Complex links between dietary lipids, endogenous endotoxins and metabolic inflammation. **Biochimie**, v. 93, n. 1, p. 39–45, 2011.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, 1993.

LI, C. et al. Macrophage polarization and meta-inflammation. **Translational Research**, v. 191, p. 29–44, 2018.

LI, L. et al. Blood Orange Juice Consumption Increases Flow-Mediated Dilation in Adults with Overweight and Obesity: A Randomized Controlled Trial. **The Journal of Nutrition**, v. 150, n. 9, p. 2287–2294, 2020.

LI, M. et al. Hesperidin Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation in Mice by Promoting the miRNA-132 Pathway. **Inflammation**, v. 39, n. 5, p. 1681–1689, 2016.

LI, R. D. et al. MicroRNA-144 suppresses the expression of cytokines through targeting RANKL in the matured immune cells. **Cytokine**, v. 108, p. 197-204, 2018.

LI, X.; SUN, M.; LONG, Y. Cyanidin-3-O-Glucoside Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Human Corneal Epithelial Cells by Inducing Let-7b-5p-Mediated HMGA2/PI3K/Akt Pathway. **Inflammation**, v. 43, n. 3, p. 1088-1096, 2020.

LIANG, Y. Z. et al. Identification of Neuroendocrine Stress Response-Related Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Type 2 Diabetes Mellitus and Insulin Resistance. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 9, p. 132, 2018.

LIMA, R. T. et al. MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer. **European Journal of Cancer**, v. 47, n. 2, p. 163–174, 2011.

LINDSEY, R. C.; CHENG, S.; MOHAN, S. Vitamin C effects on 5-hydroxymethylcytosine and gene expression in osteoblasts and chondrocytes: Potential involvement of PHD2. **PLoS One**, v. 14, n. 8, p. e0220653, 2019.

LINNEWIEL-HERMONI, K. et al. Carotenoid derivatives inhibit nuclear factor kappa B activity in bone and cancer cells by targeting key thiol groups. **Free Radic Biol Med**, v. 75, p. 105-20, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOWE, G. D. O. Circulating inflammatory markers and risks of cardiovascular and non-cardiovascular disease. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 8, p. 1618–1627, 2005.

MA, Y. et al. MiR-150 predicts survival in patients with sepsis and inhibits LPS-induced inflammatory factors and apoptosis by targeting NF- κ B1 in human umbilical vein endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 500, n. 3, p. 828-837, 2018.

MACCARONE, E.; MACCARRONE, A.; RAPISARDA, P. Stabilization of Anthocyanins of Blood Orange Fruit Juice. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 4, p. 901–904, 1985.

MANČEK-KEBER, M.; JERALA, R. Postulates for validating TLR4 agonists: Highlights. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 2, p. 356–370, 2015.

MARTIN, K. R.; APPEL, C. L. Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. **Nutrition and Dietary Supplements**, v. 2010:2, p. 1–12, 2009.

MIGITA, K. et al. Lipopolysaccharide signaling induces serum amyloid A (SAA) synthesis in human hepatocytes in vitro. **FEBS Letters**, v. 569, n. 1–3, p. 235–239, 2004.

MILANI, A. et al. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1290-1324, 2017.

MILENKOVIC, D. et al. Hesperidin displays relevant role in the nutrigenomic effect of orange juice on blood leukocytes in human volunteers: a randomized controlled cross-over study. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e26669, 2011.

MILENKOVIC, D. et al. Modulation of miRNA Expression by Dietary Polyphenols in apoE Deficient Mice: A New Mechanism of the Action of Polyphenols. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e29837, 2012.

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.

MILLÁN, J. et al. Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. **Vascular Health and Risk Management**, v. 5, p. 757-65, 2009.

MONROY, A. et al. Impaired regulation of the TNF- α converting enzyme/tissue inhibitor of metalloproteinase 3 proteolytic system in skeletal muscle of obese type 2 diabetic patients: a new mechanism of insulin resistance in humans. **Diabetologia**, v. 52, n. 10, p. 2169–2181, 2009.

MONTEIRO, C. A. et al. Increasing consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health: evidence from Brazil. **Public Health Nutrition**, v. 14, n. 01, p. 5–13, 2011.

MORAND, C. et al. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, n. 1, p. 73–80, 2011.

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.

MORI, M. A. et al. Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. **Cell Metabolism**, v. 30, n. 4, p. 656-673, 2019.

NAIR, P. et al. Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway. **Methods Enzymology**, v. 544, p. 99-128, 2014.

NAMAZI, N.; LARIJANI, B.; AZADBAKHT, L. Dietary Inflammatory Index and its Association with the Risk of Cardiovascular Diseases, Metabolic Syndrome, and Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Hormone and Metabolic Research**, v. 50, n. 05, p. 345–358, 2018.

NAPPO, F. et al. Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: Role of fat and carbohydrate meals. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 39, n. 7, p. 1145–1150, 2002.

O'KEEFE, J. H.; GHEEWALA, N. M.; O'KEEFE, J. O. Dietary Strategies for Improving Post-Prandial Glucose, Lipids, Inflammation, and Cardiovascular Health. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 51, n. 3, p. 249–255, 2008.

OKADA, C. et al. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. **Science**, v. 326, n. 5957, p. 1275–1279, 2009.

OLIVAS-AGUIRRE, F. et al. Cyanidin-3-O-glucoside: Physical-Chemistry, Foodomics and Health Effects. **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1264, 2016.

ORTEGA, F. B.; LAVIE, C. J.; BLAIR, S. N. Obesity and Cardiovascular Disease. **Circulation Research**, v. 118, n. 11, p. 1752–1770, 2016.

ORTEGA, F. J. et al. MiRNA Expression Profile of Human Subcutaneous Adipose and during Adipocyte Differentiation. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, p. e9022, 2010.

OUDEMANS-VAN STRAATEN, H. M.; MAN, A. M. S.; DE WAARD, M. C. Vitamin C revisited. **Critical Care**, v. 18, n. 4, 2014.

OZDEMIR, D.; FEINBERG, M. W. MicroRNA in diabetic wound healing: Pathophysiology and therapeutic opportunities. **Trends in Cardiovascular Medicine**, 2018.

PARASKEVAS, K. I. et al. The role of fibrinogen and fibrinolysis in peripheral arterial disease. **Thrombosis Research**, v. 122, n. 1, p. 1–12, 2008.

PASTERNAK, T. et al. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 418, p. 1991–2001, 2005.

PELUSO, I.; PALMERY, M. Flavonoids at the pharma-nutrition interface: Is a therapeutic index in demand? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 71, p. 102–107, 2015.

PETRY, F. C.; MERCADANTE, A. Z. New Method for Carotenoid Extraction and Analysis by HPLC-DAD-MS/MS in Freeze-Dried Citrus and Mango Pulps. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 1, p. 205-215, 2018.

PRIOR, R. L. et al. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of Plasma and Other Biological and Food Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273–3279, 2003.

PU, P. et al. Naringin ameliorates metabolic syndrome by activating AMP-activated protein kinase in mice fed a high-fat diet. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 518, n. 1, p. 61–70, 2012.

QIAN, C. et al. Nanoemulsion delivery systems: influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1440-7, 2012.

QIAN, P. et al. Cyanidin ameliorates cisplatin-induced cardiotoxicity via inhibition of ROS-mediated apoptosis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 2017.

QUINTANILHA, B. J. et al. Circulating plasma microRNAs dysregulation and metabolic endotoxemia induced by a high-fat high-saturated diet. **Clinical Nutrition**, v. 39, n. 2, p. 554-562, 2020.

QUINTANILHA, B. et al. Nutrimiromics: Role of microRNA and Nutrition in Modulating Inflammation and Chronic Diseases. **Nutrients**, v. 9, n. 11, p. 1168, 2017.

REMELY, M. et al. Therapeutic perspectives of epigenetically active nutrients. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 11, p. 2756–2768, 2015.

RHODES, B.; FÜRNRÖHR, B. G.; VYSE, T. J. C-reactive protein in rheumatology: biology and genetics. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 5, p. 282–289, 2011.

RITCHIE, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 7, p. e47, 2015.

RIZZA, S. et al. Citrus Polyphenol Hesperidin Stimulates Production of Nitric Oxide in Endothelial Cells while Improving Endothelial Function and Reducing Inflammatory Markers in Patients with Metabolic Syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 5, p. E782–E792, 2011.

ROME, S. Use of miRNA in biofluids as biomarkers in dietary and lifestyle intervention studies. **Genes & Nutrition**, v. 10, n. 5, 2015.

ROSS, S. A.; DAVIS, C. D. The Emerging Role of microRNA and Nutrition in Modulating Health and Disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 305–336, 2014.

SALAMONE, F. et al. Moro orange juice prevents fatty liver in mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 29, p. 3862, 2012.

SANDRI, S. et al. Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 5, p. 1174–1180, 2008.

SEKAR, S. et al. Saturated fatty acids induce development of both metabolic syndrome and osteoarthritis in rats. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

SELEM, S. S. DE C. et al. Validity and reproducibility of a food frequency questionnaire for adults of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, n. 4, p. 852–859, 2014.

SEN, P.; KEMPPAINEN, E.; OREŠIČ, M. Perspectives on Systems Modeling of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 4, p. 96, 2017.

SHIVDASANI, R. A. MicroRNA: regulators of gene expression and cell differentiation. **Blood**, v. 108, n. 12, p. 3646–3653, 2006.

SILVEIRA, B. K. S. et al. Dietary Pattern and Macronutrients Profile on the Variation of Inflammatory Biomarkers: Scientific Update. **Cardiology Research and Practice**, v. 2018, p. 4762575, 2018.

SINGHAL, S. S. et al. Didymin: an orally active citrus flavonoid for targeting neuroblastoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 17, p. 29428-29441, 2017.

SIROTKIN, A. V. et al. MicroRNAs control transcription factor NF- κ B (p65) expression in human ovarian cells. **Functional and Integrative Genomics**, v. 15, n. 3, p. 271-5, 2015.

SKOGEN, W. F. et al. Fibrinogen-derived peptide B beta 1-42 is a multidomained neutrophil chemoattractant. **Blood**, v. 71, n. 5, p. 1475–1479, 1988.

SLATTERY, M. et al. Diet and lifestyle factors associated with miRNA expression in colorectal tissue. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**, v. Volume10, p. 1–16, 2016.

SLAVIN, J. L.; LLOYD, B. Health Benefits of Fruits and Vegetables. **Advances in Nutrition**, v. 3, n. 4, p. 506–516, 2012.

SMILEY, S. T.; KING, J. A.; HANCOCK, W. W. Fibrinogen Stimulates Macrophage Chemokine Secretion Through Toll-Like Receptor 4. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 5, p. 2887–2894, 2001.

SMITH, K. B.; SMITH, M. S. Obesity Statistics. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 43, n. 1, p. 121–135, 2016.

STEINBERG, G. R. et al. Tumor necrosis factor α -induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 6, p. 465–474, 2006.

SU, C. et al. Neohesperidin Dihydrochalcone versus CCl₄-Induced Hepatic Injury through Different Mechanisms: The Implication of Free Radical Scavenging and Nrf2 Activation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 22, p. 5468-75, 2015.

SUANTAWEE, T. et al. Cyanidin Stimulates Insulin Secretion and Pancreatic β -Cell Gene Expression through Activation of I-type Voltage-Dependent Ca²⁺ Channels. **Nutrients**, v. 9, n. 8, p. 814, 2017.

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.

SUN, L. et al. Red Blood Cells as Potential Repositories of MicroRNAs in the Circulatory System. **Frontiers in Genetics**, v. 11, p. 442, 2020.

SUN, Y.; LI, L. Cyanidin-3-glucoside inhibits inflammatory activities in human fibroblast-like synoviocytes and in mice with collagen-induced arthritis. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 45, n. 10, p. 1038–1045, 2018.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63-68, 1959.

TAHAMTAN, A. et al. Anti-Inflammatory MicroRNA and Their Potential for Inflammatory Diseases Treatment. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1377, 2018.

TAKIKAWA, M. et al. Dietary Anthocyanin-Rich Bilberry Extract Ameliorates Hyperglycemia and Insulin Sensitivity via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Diabetic Mice. **The Journal of Nutrition**, v. 140, n. 3, p. 527–533, 2010.

TAO, H. et al. MiR-126 Suppresses the Glucose-Stimulated Proliferation via IRS-2 in INS-1 β Cells. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149954, 2016.

TAO, L. et al. MiR-144 protects the heart from hyperglycemia-induced injury by regulating mitochondrial biogenesis and cardiomyocyte apoptosis. **FASEB journal**, v. 34, n. 2, p. 2173-2197, 2020.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, n. 2, p. 100-10, 2004.

TIFFON, C. The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human Health and Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, 2018.

TITTA, L. et al. Blood orange juice inhibits fat accumulation in mice. **International Journal of Obesity**, v. 34, n. 3, p. 578–588, 2010.

TOBIAS, P. S.; TAPPING, R. I.; GEGNER, J. A. Endotoxin Interactions with Lipopolysaccharide-Responsive Cells. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 3, p. 476–481, 1999.

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.

TRIPOLI, E. et al. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 466–479, 2007.

TSANG, W. P.; KWOK, T. T. Epigallocatechin gallate up-regulation of miR-16 and induction of apoptosis in human cancer cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 2, p. 140–146, 2010.

UEKI, K. et al. Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 28, p. 10422–10427, 2004.

UNICAMP. **Tabela brasileira de composição de alimentos (TACO)**. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA, Universidade Estadual de Campinas: Campinas, 2011.

USDA. **Department of Agriculture, Agricultural Research Service. FoodData Central**. Disponível em: <<https://fdc.nal.usda.gov/>>. Acesso em: 4 out. 2020.

VÁZQUEZ C. et al. Effects of two highly monounsaturated oils on lipid composition and enzyme activities in rat jejunum. **Bioscience Reports**, v. 20, n. 5, p. 355-68, 2000.

VENDRAME, S.; KLIMIS-ZACAS, D. Anti-inflammatory effect of anthocyanins via modulation of nuclear factor- B and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. **Nutrition Reviews**, v. 73, n. 6, p. 348–358, 2015.

VERBEEK, R.; HOVINGH, G. K.; BOEKHOLDT, S. M. Non-high-density lipoprotein cholesterol: current status as cardiovascular marker. **Current Opinion in Lipidology**, v. 26, n. 6, p. 502-10, 2015.

VIDAL, M. DE F. CITRICULTURA NA ÁREA DE ATUAÇÃO DO BNB. p. 11, 2019.

VOLP, A. C. P. et al. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica: Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, p. 537–549, 2008.

WALLACE, T. C.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins. **Advances in Nutrition**, v. 6, n. 5, p. 620–622, 2015.

WANG, D. et al. Gut microbiota metabolism of anthocyanin promotes reverse cholesterol transport in mice via repressing miRNA-10b. **Circulation Research**, v. 111, n. 8, p. 967–981, 2012.

WANG, L. et al. Anticancer activities of citrus peel polymethoxyflavones related to angiogenesis and others. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 453972, 2014.

WANG, P. et al. MiR-130b attenuates vascular inflammation via negatively regulating tumor progression locus 2 (Tpl2) expression. **International Immunopharmacology**, v. 51, p. 9-16, 2017.

WANG, X. et al. Determination of 14 circulating microRNAs in Swedes and Iraqis with and without diabetes mellitus type 2. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86792, 2014.

WATTERS, T. M.; KENNY, E. F.; O'NEILL, L. A. J. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 6, p. 411–419, 2007.

WHO. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation**. Geneva, Suíça: World Health Organization, 2003.

WHO. **Fruit and vegetable promotion initiative-report of the meeting**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2003.

WHO. **Obesity and overweight**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2021.

WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. **World Health Organization Technical Report Series**, v. 854, p. 1–452, 1995.

WHO. **Waist circumference and waist-hip ratio: report of a WHO expert consultation**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 8-11 de dezembro de 2008.

WOJDASIEWICZ, P.; PONIATOWSKI, Ł. A.; SZUKIEWICZ, D. The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–19, 2014.

XAGORARI, A.; ROUSSOS, C.; PAPAPETROPOULOS, A. Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by the flavonoid luteolin. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 7, p. 1058-64, 2002.

XIE, H.; LIM, B.; LODISH, H. F. MicroRNA Induced During Adipogenesis that Accelerate Fat Cell Development Are Downregulated in Obesity. **Diabetes**, v. 58, n. 5, p. 1050–1057, 2009.

XU, G. et al. microR-142-3p down-regulates IRAK-1 in response to Mycobacterium bovis BCG infection in macrophages. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 93, n. 6, p. 606-11, 2013.

YE, R. D.; SUN, L. Emerging functions of serum amyloid A in inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 98, n. 6, p. 923–929, 2015.

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.

YU, C. D. et al. Inhibition of miR-126 protects chondrocytes from IL-1 β induced inflammation via upregulation of Bcl-2. **Bone & Joint Research**, v. 7, n. 6, p. 414-421, 2018.

ZHANG, H. et al. Genistein Protects Against Ox-LDL-Induced Inflammation Through MicroRNA-155/SOCS1-Mediated Repression of NF- κ B Signaling Pathway in HUVECs. **Inflammation**, v. 40, n. 4, p. 1450–1459, 2017.

ZHANG, J. et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 17-24, 2015.

ZHONG, X. et al. Inflammatory potential of diet and risk of cardiovascular disease or mortality: A meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

ZHOU, J. L. et al. Hsa-let-7g promotes osteosarcoma by reducing HOXB1 to activate NF- κ B pathway. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v. 109, p. 2335-2341, 2019.

ZHOU, K. et al. Targeting tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment. **Oncology Letters**, v. 20, n. 5, p. 234, 2020.

ZHOU, S. et al. miRNA in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 39, n. 7, p. 1073–1084, 2018.

ZHU, D. et al. MicroRNA-17/20a/106a modulate macrophage inflammatory responses through targeting signal-regulatory protein α . **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 2, p. 426-36.e8, 2013.

ZHU, H. et al. EGFR signals downregulate tumor suppressors miR-143 and miR-145 in Western diet-promoted murine colon cancer: role of G1 regulators. **Molecular Cancer Research**, v. 9, n. 7, p. 960–975, 2011.

ZHU, H. et al. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. **Cell**, v. 147, n. 1, p. 81-94, 2011.

ZHU, H.; LEUNG, S. W. Identification of microRNA biomarkers in type 2 diabetes: a meta-analysis of controlled profiling studies. **Diabetologia**, v. 58, n. 5, p. 900-11, 2015.

ANEXOS

ANEXO 1





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



 **GENUIN**
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA - USP

 **FoRC**
FOOD RESEARCH CENTER
Centro de Pesquisa em Alimentos

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

ANEXO 2

Questionário para a caracterização e a confirmação da adequação 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"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> Idade: <input type="text"/>
Vegetariano?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Atleta?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Pratica exercício físico?*	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
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?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Ex-fumante? (mín. 5 anos)	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Ingere bebida alcóolica?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
	Quanto? <input type="text"/>
	Frequência? <input type="text"/>
Ingere com frequência suco natural de uva?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
	Quanto? <input type="text"/>
	Frequência? <input type="text"/>
Ingere com frequência suco natural de laranja?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
	Quanto? <input type="text"/>
	Frequência? <input type="text"/>

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="checkbox"/>				
Medicação/Suplemento?		Sim	<input type="checkbox"/>	Quais?	
		Não	<input type="checkbox"/>		
Fazer uso de medicação prescrita para controlar inflamação?		Sim	<input type="checkbox"/>	Quais?	
		Não	<input type="checkbox"/>		
Gravidez?	Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>	
Anticoncepcional?	Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<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"/>			
	Não	<input type="checkbox"/>	Motivo(s):		
DATA DA INTERVENÇÃO	<input type="text"/>				
SUCO	<input type="text"/>				
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.:	

ANEXO 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO: Efeito crônico do suco de laranja sanguínea 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 laranja sanguínea 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 laranja sanguínea. 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 laranja sanguínea. 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);
- ✓ Vinícius Cooper Capetini - aluno 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 (11-30617779) 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

Cronograma das coletas e instruções entregue às voluntárias



Calendário do Projeto

//_	Entrevista para inclusão no estudo
Cuidados Pré-colheita de Sangue	Não ingerir bebida alcoólica 7 dias antes da colheita de sangue
	Não praticar atividade física 48 horas antes da colheita de sangue
	Jejum alimentar por 12 horas antes da colheita de sangue
//_ <i>Local: Centro de Saúde Escola Geraldo de Paula Souza (CSEGPS) – Faculdade de Saúde Pública</i>	1ª Colheita de sangue Entrega de Fezes Aplicação de questionário sobre o consumo alimentar Avaliação Antropométrica Entrega de 2 litros de Suco
//_	Entrega de 7 litros de suco pelo motoboy para ingestão de 14 dias
Cuidados Pré-colheita de Sangue	Não ingerir bebida alcoólica 7 dias antes da colheita de sangue
	Não praticar atividade física 48 horas antes da colheita de sangue
	Jejum alimentar por 12 horas antes da colheita de sangue
//_ <i>Local: Centro de Saúde Escola Geraldo de Paula Souza (CSEGPS) – Faculdade de Saúde Pública</i>	2ª Colheita de sangue Entrega de Fezes Aplicação de questionário sobre o consumo alimentar Avaliação Antropométrica Entrega de 2 litros de Suco
//_	Entrega de 7 litros de suco pelo motoboy para ingestão de 14 dias
Cuidados Pré-colheita de Sangue	Não ingerir bebida alcoólica 7 dias antes da colheita de sangue
	Não praticar atividade física 48 horas antes da colheita de sangue
	Jejum alimentar por 12 horas antes da colheita de sangue
//_ <i>Local: Centro de Saúde Escola Geraldo de Paula Souza (CSEGPS) – Faculdade de Saúde Pública</i>	3ª Colheita de sangue Entrega de Fezes Aplicação de questionário sobre o consumo alimentar Avaliação Antropométrica

Observação: Dúvidas entrar em contato com Bruna (11) 955599891 ou Vinícius (11) 942871072

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



ANEXO 5

Recordatório alimentar de 24 horas

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

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

ANEXO 6

Valores de referência das análises bioquímicas – Hospital Universitário da USP

ANÁLISE	VALOR DE REFERÊNCIA
Amilase	28 a 100 U/L
ALT	Até 33 U/L - mulheres
AST	Até 32 U/L - mulheres
Cálcio	8,6 a 10 mg/dL - 18 a 59 anos
Colesterol total	Desejável: < 190 mg/dL - 20 a 150 anos
LDL colesterol	Categoria de risco: Baixo < 130 mg/dL (20 a 150 anos) Intermediário < 100 mg/dL Alto < 70 mg/dL Muito alto < 50 mg/dL
Colesterol não HDL	Categoria de risco: Baixo < 160 mg/dL (20 a 150 anos) Intermediário < 130 mg/dL Alto < 100 mg/dL Muito alto < 80 mg/dL
HDL colesterol	Desejável: > 40 mg/dL – 20 a 150 anos
GGT	5 a 36 U/L – mulheres
Magnésio	1,7 a 2,2 mg/dL (13 a 20 anos) 1,6 a 2,6 mg/dL (21 a 59 anos)
Triacilglicerol	Desejável: < 150 mg/dL – 20 a 150 anos
Ureia	17 a 49 mg/dL
Creatinina	0,5 a 0,9 mg/dL – mulheres acima de 15 anos
Sódio	136 a 145 mEq/L
Potássio	3,5 a 5,1 mEq/L
Cloreto	98 a 107 mEq/L
Proteína C reativa	< 8 mg/dL – Inflamação
Proteína C reativa	Risco cardíaco: Baixo < 1,0 mg/dL Médio 1,0 a 3,0 mg/dL Alto > 3,0 mg/dL
D-dímero	< 500 ng/mL
Fibrinogênio	200 a 393 mg/dL
Hemoglobina	12,0 a 16,0 g/dL
Glicemia	Normal ≤ 99 mg/dL; Alterada: 100 a 125 mg/dL; Hipoglicemia: < 70 mg/dL. Diabetes: ≥ 126 mg/dL;
Adiponectina	5 a 28 µg/mL – IMC 25 a 29,9 kg/m ²
Leptina	3,70 A 11,10 ng/mL – mulheres

ANEXO 7

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

miRNA	Sequência Genética	miRNA	Sequência Genética
hsa-miR-652-3p	AAUGGCGCCACUAGGGUUGUG	hsa-let-7i-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUCUGUU
hsa-miR-181a-5p	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	hsa-miR-26b-5p	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU
hsa-miR-221-3p	AGCUACAUUGUCUGUCGGUUUC	hsa-miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU
hsa-let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	hsa-miR-320b	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAA
hsa-miR-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	hsa-miR-590-5p	GAGCUUAUUCUAUAAAAGUGCAG
hsa-miR-374b-5p	AUAUAAUACAACCUAGUAAGUG	hsa-miR-191-5p	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG
hsa-miR-93-5p	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG	hsa-miR-99a-5p	AACCCGUAAGAUCCGAUCUUGUG
hsa-miR-200a-3p	UACACUGUCUGGUAACGAUGU	hsa-miR-301a-3p	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAAGC
hsa-miR-484	UCAGGCUCAGUCCCCUCCCGAU	hsa-miR-151a-5p	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU
hsa-miR-106a-5p	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	hsa-miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG
hsa-miR-145-5p	GUCCAGUUUCCAGGAUCCCU	hsa-miR-423-5p	UGAGGGGCGAGAGCGAGACUUU
hsa-miR-185-5p	UGGAGAGAAAGGCAGUCCUGA	hsa-miR-101-3p	UACAGUACUGUGAAUACUGAA
hsa-miR-486-5p	UCCUGUACUGAGCUGCCCGAG	hsa-miR-365a-3p	UAAUGCCCCUAAAAUCCUUAU
hsa-miR-26a-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	hsa-miR-23a-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUUC
hsa-miR-143-3p	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	hsa-miR-215	AUGACCUAUGAAUUGACAGAC
hsa-miR-30a-5p	UGUAAACAUCUCGACUGGAAG	hsa-miR-320a	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA
hsa-miR-222-3p	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	hsa-miR-338-3p	UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUG
hsa-miR-342-3p	UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU	hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA
hsa-miR-324-5p	CGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUGU	hsa-miR-103a-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA
hsa-let-7e-5p	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	hsa-miR-331-3p	GCCCCUGGGCCUAUCCUAGAA
hsa-miR-139-5p	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAGU	hsa-miR-142-3p	UGUAGUGUUCCUACUUUAUGGA
hsa-miR-375	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	hsa-let-7d-3p	CUAUACGACCUGCUGCCUUUCU
hsa-miR-451a	AAACCGUUACCAUUCAGAGUU	hsa-miR-605	UAAAUCCCAUGGUGCCUUCUCCU
hsa-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	hsa-miR-19a-3p	UGUGCAAUCUAUGCAAACUGA
hsa-miR-128	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	hsa-miR-144-3p	UACAGUAUAGAUGAUGUACU
hsa-miR-125a-5p	UCCUGAGACCCUUUAACCGUGA	hsa-miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUUAUGCG
hsa-miR-485-3p	GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU	hsa-miR-148a-3p	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU
hsa-let-7b-3p	CUAUACAACCUACUGCCUCC	hsa-miR-10b-5p	UACCCUGUAGAACCGAUUUGUG
hsa-miR-25-3p	CAUUGCACUUGUCUGGUCUGA	hsa-miR-195-5p	UAGCAGCACAGAAUUAUUGGC
hsa-miR-33a-5p	GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA	hsa-miR-125b-5p	UCCUGAGACCCUAACUUGUGA
hsa-miR-16-5p	UAGCAGCACGUAUUAUUGGCG	hsa-miR-192-5p	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC
hsa-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	hsa-miR-18b-5p	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGUUAG
hsa-miR-152	UCAGUGCAUGACAGAACUUGG	hsa-miR-335-5p	UCAAGAGCAAUACGAAAAUUGU
hsa-miR-30c-5p	UGUAAACAUCUACACUCUCAGC	hsa-miR-204-5p	UUCUUUUGUCAUCCUAGGCCU
hsa-miR-197-3p	UUCACCACCUUCCACCCAGC	hsa-let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU
hsa-miR-99b-5p	CACCCGUAAGAACCAGCCUUGCG	hsa-miR-22-3p	AAGCUGCCAGUUGAAGAUCUGU
hsa-miR-30e-5p	UGUAAACAUCUUGACUGGAAG	hsa-miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA
hsa-miR-146a-5p	UGAGAACUGAAUUCUAGGGUU	hsa-miR-19b-3p	UGUGCAAUCCUAGCAAACUGA
hsa-miR-424-5p	CAGCAGCAAUUCUAGUUUUGAA	hsa-miR-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAUUCGGUUA
hsa-miR-107	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	hsa-miR-150-5p	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG
hsa-miR-148b-3p	UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU	hsa-miR-30b-5p	UGUAAACAUCUACACUCAGCU
hsa-miR-20a-5p	UAAAGUGCUUUAUAGUCAGGUAG	hsa-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG
hsa-miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	hsa-miR-502-3p	AAUGCACCUUGGCAAGGAUUCA
hsa-miR-30d-5p	UGUAAACAUCUCCGACUGGAAG	hsa-miR-339-3p	UGAGCGCCUCGACGACAGAGCCG
hsa-miR-186-5p	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGCU	hsa-miR-409-3p	GAAUGUUGCUCGGUGAACCCCU

miRNA	Sequência Genética
hsa-miR-154-5p	UAGGUUAUCCGUGUUGCCUUCG
hsa-miR-155-5p	UUAUUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
hsa-miR-140-3p	UACCACAGGGUAGAACCACGG
hsa-miR-92b-3p	UAUUGCACUCGUCCCGCCUCC
hsa-miR-505-3p	CGUCAACACUUGCUGGUUUCCU
hsa-miR-23b-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC
hsa-miR-141-3p	UAACACUGUCUGGUAAGAUGG
hsa-miR-10a-5p	UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG
hsa-miR-27a-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCGCG
hsa-miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU
hsa-miR-382-5p	GAAGUUGUUCGUGGUGGAUUCG
hsa-miR-32-5p	UAUUGCACAUUACUAAGUUGCA
hsa-miR-133b	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG
hsa-let-7d-5p	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU
hsa-miR-133a	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG
hsa-miR-20b-5p	CAAAGUCUCAUAGUGCAGGUAG
hsa-miR-328	CUGGCCUCUCUGCCCUUCCGU
hsa-miR-532-3p	CCUCCACACCCAAGGCUUGCA
hsa-miR-15a-5p	UAGCAGCAUAUAGGUUUUGUG
hsa-miR-532-5p	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCGU
hsa-miR-194-5p	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA
hsa-miR-660-5p	UACCCAUUGCAUAUCGGAGUUG
hsa-miR-574-3p	CACGCUCAUGCACACCCACA
hsa-miR-551b-3p	GCGACCAUACUUGGUUUCAG
hsa-miR-130a-3p	CAGUGCAAUGUAAAAGGGCAU
hsa-miR-28-5p	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG
hsa-miR-497-5p	CAGCAGCACACUGGGUUUGU
hsa-miR-425-3p	AUCGGAAUGUCGUGUCCGCC
hsa-miR-132-3p	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG
hsa-let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
hsa-miR-18a-5p	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG
hsa-miR-29b-3p	UAGACCAUUUGAAAUCAGUGUU
hsa-miR-136-5p	ACUCCAUUUGUUUGAUGAUGGA
hsa-let-7i-3p	CUGCGCAAGCUACUGCCUUGCU
hsa-miR-106b-5p	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU
hsa-miR-15b-3p	CGAAUCAUUAUUGCUGCUCUA
hsa-miR-142-5p	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU
hsa-miR-296-5p	AGGGCCCCCUCAAUCCUGU
hsa-miR-326	CCUCUGGGCCCUUCCUCCAG
hsa-miR-421	AUCAACAGACAUUAAUUGGGCGC
hsa-miR-223-5p	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU
hsa-miR-146b-5p	UGAGAACUGAAUCCAUGGCU
hsa-miR-205-5p	UCCUUAUUCACCCGGAGUCUG
hsa-miR-339-5p	UCCUGUCCUCCAGGAGCUCAG
hsa-miR-500a-5p	UAAUCCUUGCUACCUUGGGUGAGA

miRNA	Sequência Genética
hsa-miR-378a-3p	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG
hsa-miR-425-5p	AAUGACACGAUCACUCCCGUUGA
hsa-miR-346	UGUCUGCCCGCAUGCCUGCCUCU
hsa-miR-193b-3p	AACUGGCCCUCAAAGUCCCGCU
hsa-miR-885-5p	UCCAUUACACUACCCUGCCUCU
hsa-miR-127-3p	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU
hsa-miR-208a	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU
hsa-miR-16-2-3p	CCAAUUAUACUGUCUGCUUUA
hsa-miR-140-5p	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG
hsa-miR-130b-3p	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU
hsa-miR-20a-3p	ACUGCAUUAUGAGCACUUAAG
hsa-miR-629-5p	UGGGUUUACGUUGGGAGAACU
hsa-miR-200c-3p	UAAUACUGCCGGGUAUUGAUGGA
hsa-miR-501-3p	AAUGCACCCGGGCAAGGAUUCU
hsa-miR-423-3p	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU
hsa-miR-376a-3p	AUCAUAGAGGAAAAUCCACGU
hsa-miR-22-5p	AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUA
hsa-miR-2110	UUGGGGAAACGGCCGUCAGUG
hsa-miR-361-3p	UCCCCAGGUGUGAUUCUGAUUU
hsa-miR-93-3p	ACUGCUGAGCUAGCACUUCCCG
hsa-miR-144-5p	GGAUUAUCAUAUACUGUAAG
hsa-miR-210	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA
hsa-miR-199a-5p	CCCAGUGUUCAGACUACCGUUC
hsa-miR-766-3p	ACUCCAGCCCCACAGCCUCAGC
hsa-miR-584-5p	UUAUGGUUUGCCUGGGACUGAG
hsa-miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGCCUGU
hsa-miR-363-3p	AAUUGCACGGUAUCCAUCUGUA
hsa-miR-374a-5p	UUAAUAACAACCUGAUAAGUG
hsa-miR-190a	UGAUUGUUUGAUAUUAUAGGU
hsa-miR-29a-5p	ACUGAUUUUUUGGUGUUCAG
hsa-miR-18a-3p	ACUGCCCUAAGUGCUCUUCUGG
hsa-miR-151a-3p	CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG
hsa-miR-28-3p	CACUAGAUUGUGAGCUCCUGGA
hsa-miR-324-3p	ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG
hsa-miR-182-5p	UUUGGCAAUGGUAGAUCACACU
hsa-miR-15b-5p	UAGCAGCAUCAUAGGUUUACA
hsa-miR-106b-3p	CCGCACUGUGGGUACUUGCUGC
hsa-miR-29c-3p	UAGACCAUUUGAAAUCGGUUA
hsa-miR-95	UUCAACGGGUUUUAUUGAGCA
hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
hsa-miR-30e-3p	CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC
hsa-miR-543	AAACAUUCGCGGUGCACUUCUU
hsa-miR-29b-2-5p	CUGGUUUACAUGGUGGCUUAG
hsa-miR-495-3p	AAACAAACAUGGUGCACUUCUU

ANEXO 8

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

miRNA	Sequência Genética	miRNA	Sequência Genética
hsa-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	hsa-miR-183-5p	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU
hsa-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGUU	hsa-miR-185-5p	UGGAGAGAAAGGCAGUUCUGA
hsa-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGUU	hsa-miR-186-5p	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU
hsa-let-7d-5p	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	hsa-miR-18b-5p	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGUUAG
hsa-let-7e-5p	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	hsa-miR-195-5p	UAGCAGCACAGAAAUUUGGC
hsa-let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	hsa-miR-199a-5p	CCCAGUGUUCAGACUACCUUUUC
hsa-let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	hsa-miR-19a-3p	UGUGCAAUCUAUGCAAACUGA
hsa-let-7i-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUGUGUU	hsa-miR-19b-3p	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA
hsa-miR-100-5p	AACCCGUAUAUCCGAACUUGUG	hsa-miR-202-3p	AGAGGUUAUAGGGCAUGGGAA
hsa-miR-101-3p	UACAGUACUGUAUACUGAA	hsa-miR-206	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUG
hsa-miR-103a-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	hsa-miR-208a-3p	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU
hsa-miR-106b-5p	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU	hsa-miR-208b-3p	AUAAGACGAACAAAAGGUUUGU
hsa-miR-107	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	hsa-miR-20a-5p	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG
hsa-miR-10b-5p	UACCCUGUAGAACCGAAUUGUG	hsa-miR-20b-5p	CAAAGUGCUCUAGUGCAGGUAG
hsa-miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	hsa-miR-210-3p	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA
hsa-miR-124-3p	UAAGGCACGCGUGAAUGCC	hsa-miR-211-5p	UUCUUUUGUCAUCCUUCGCCU
hsa-miR-125a-5p	UCCCUAGACCCUUUAACCUUGUGA	hsa-miR-214-3p	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU
hsa-miR-125b-5p	UCCCUAGACCCUAAUUGUGA	hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUUGA
hsa-miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	hsa-miR-221-3p	AGCUACAUUGUCUGCGGGUUUC
hsa-miR-128-3p	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	hsa-miR-222-3p	AGCUACAUCUGGCUCACUGGGU
hsa-miR-130a-3p	CAGUGCAAUGUUAAAAGGGCAU	hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAUACCCCA
hsa-miR-130b-3p	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU	hsa-miR-22-3p	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU
hsa-miR-1324	CCAGACAGAAUUCUAGCACUUUC	hsa-miR-224-5p	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU
hsa-miR-133a-3p	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUG	hsa-miR-23a-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC
hsa-miR-133b	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUA	hsa-miR-23b-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC
hsa-miR-1-3p	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	hsa-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG
hsa-miR-140-5p	CAGUGGUUUUACCCUAGGUAG	hsa-miR-25-3p	CAUUGCACUUGUCUGGUCUGA
hsa-miR-142-3p	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA	hsa-miR-26a-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
hsa-miR-143-3p	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	hsa-miR-26b-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
hsa-miR-144-3p	UACAGUAUAGAUGAUGUACU	hsa-miR-27a-3p	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC
hsa-miR-145-5p	GUCCAGUUUCCAGGAUCCCU	hsa-miR-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC
hsa-miR-146a-5p	UGAGAACUGAAUUCUAGGGUU	hsa-miR-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
hsa-miR-149-5p	UCUGGCUCGUGUCUUCACUCCC	hsa-miR-29b-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU
hsa-miR-150-5p	UCUCCAAACCCUUGUACCAGUG	hsa-miR-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA
hsa-miR-155-5p	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU	hsa-miR-300	UAUACAAGGGCAGACUCUCUCU
hsa-miR-15a-5p	UAGCAGCACAUAUUGGUUUUGUG	hsa-miR-301a-3p	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAAAGC
hsa-miR-15b-5p	UAGCAGCACAUAUUGGUUUACA	hsa-miR-301b-3p	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAAAGC
hsa-miR-16-5p	UAGCAGCACGUAUUUAUUGGCG	hsa-miR-302a-3p	UAAGUGCUUCCAUGUUUUGGUGA
hsa-miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	hsa-miR-302b-3p	UAAGUGCUUCCAUGUUUAGUAG
hsa-miR-181a-5p	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	hsa-miR-302c-3p	UAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGG
hsa-miR-181b-5p	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	hsa-miR-30a-5p	UGUAAACAUCUCCGACUGGAAG
hsa-miR-181c-5p	AACAUUCAACCUUGUCGGUGAGU	hsa-miR-30b-5p	UGUAAACAUCUCCGACUCAGCU
hsa-miR-181d-5p	AACAUUCAUUGUUGUCGGUGGGU	hsa-miR-30c-5p	UGUAAACAUCUCCGACUCAGCU
hsa-miR-182-5p	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU	hsa-miR-30d-5p	UGUAAACAUCUCCGACUGGAAG
hsa-miR-182-5p	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU	hsa-miR-30d-5p	UGUAAACAUCUCCGACUGGAAG

miRNA	Sequência Genética
hsa-miR-30e-5p	UGUAAACAUCUUGACUGGAAG
hsa-miR-31-5p	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU
hsa-miR-320a	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA
hsa-miR-328-3p	CUGGCCUCUCUGCCCUUCCGU
hsa-miR-340-5p	UUUAUAAAGCAAUGAGACUGAUU
hsa-miR-342-3p	UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU
hsa-miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUAGCUGGUUGU
hsa-miR-34c-5p	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC
hsa-miR-365a-3p	UAAUGCCCCUAAAAUCCUUAU
hsa-miR-372-3p	AAAGUGCUGCGACAUUUGAGCGU
hsa-miR-373-3p	GAAGUGCUCGAAUUUUGGGGUGU
hsa-miR-374a-5p	UUUAUUAUCAACCGUAUAGUG
hsa-miR-378a-3p	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGGC
hsa-miR-381-3p	UAUACAAGGGCAAGCUCUCUGU
hsa-miR-410-3p	AAUUAACACAGAUGGCCUGU
hsa-miR-423-3p	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU
hsa-miR-424-5p	CAGCAGCAAUUCAUGUUUGAA
hsa-miR-449a	UGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGU
hsa-miR-449b-5p	AGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGC
hsa-miR-451a	AAACCGUUACCAUACUGAGUU
hsa-miR-454-3p	UAGUGCAAUAUUGCUUAUAGGGU
hsa-miR-486-5p	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG
hsa-miR-494-3p	UGAAACAUAACACGGGAAACCUC
hsa-miR-497-5p	CAGCAGCACACUGUGGUUUGU
hsa-miR-499a-5p	UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU
hsa-miR-511-5p	GUGUCUUUUGCUCUGCAGUCA
hsa-miR-513b-5p	UUCACAAGGAGGUGUCAUUUAU
hsa-miR-519c-3p	AAAGUGCAUCUUUUUAGAGGAU
hsa-miR-519d-3p	CAAAGUGCCUCCUUUAGAGUG
hsa-miR-520d-3p	AAAGUGCUUCUCUUGGUGGGU
hsa-miR-520e	AAAGUGCUUCCUUUUUGAGGG
hsa-miR-524-5p	CUACAAAGGGAAGCACUUUCUC
hsa-miR-543	AAACAUUCGCGGUGCACUUCUU
hsa-miR-545-3p	UCAGCAAACAUUUAUUGUGUGC
hsa-miR-548c-3p	CAAAAUCUCAAUUACUUUUGC
hsa-miR-548d-3p	CAAAAACCACAGUUUCUUUUGC
hsa-miR-548e-3p	AAAAACUGAGACUACUUUUGCA
hsa-miR-590-5p	GAGCUUAUUAUAAAAGUGCAG
hsa-miR-607	GUUCAAAUCCAGAUCUAUAAC
hsa-miR-655-3p	AUAAUACAUGGUUAACCUCUUU
hsa-miR-656-3p	AAUAUUUAACAGUCAACCUCU
hsa-miR-7-5p	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU
hsa-miR-875-3p	CCUGGAAACACUGAGGUUGUG
hsa-miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGCCUGU
hsa-miR-182-5p	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU

miRNA	Sequência Genética
hsa-miR-93-5p	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG
hsa-miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
hsa-miR-98-5p	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU
hsa-miR-99a-5p	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG

ANEXO 9

Fold-change da expressão gênica de todos os miRNA plasmáticos 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro (n = 8).

miRNA	<i>Fold-change</i>	<i>p</i> valor	miRNA	<i>Fold-change</i>	<i>p</i> valor
hsa-miR-148b-3p	2,68	0,003	hsa-miR-320b	0,83	0,286
hsa-miR-106b-5p	1,84	0,009	hsa-let-7d-3p	0,80	0,306
hsa-miR-125b-5p	0,52	0,014	hsa-miR-106a-5p	1,24	0,306
hsa-miR-144-3p	2,12	0,022	hsa-miR-122-5p	0,67	0,327
hsa-miR-30e-5p	1,63	0,024	hsa-miR-27b-3p	0,80	0,334
hsa-miR-15a-5p	1,74	0,031	hsa-miR-24-3p	0,82	0,347
hsa-miR-101-3p	1,52	0,046	hsa-miR-320a	0,84	0,354
hsa-miR-107	1,84	0,054	hsa-miR-18b-5p	1,25	0,354
hsa-miR-150-5p	0,63	0,059	hsa-miR-99b-5p	0,76	0,364
hsa-miR-451a	1,68	0,060	hsa-miR-126-5p	1,21	0,370
hsa-miR-425-5p	1,47	0,066	hsa-miR-29a-3p	1,22	0,383
hsa-miR-22-3p	1,56	0,066	hsa-miR-30d-5p	0,85	0,399
hsa-miR-342-3p	0,67	0,078	hsa-miR-19b-3p	1,19	0,434
hsa-miR-152-3p	0,59	0,083	hsa-miR-30b-5p	0,86	0,484
hsa-miR-19a-3p	1,45	0,087	hsa-miR-361-5p	0,87	0,506
hsa-let-7a-5p	0,73	0,089	hsa-miR-423-3p	1,24	0,512
hsa-miR-126-3p	0,71	0,095	hsa-let-7i-5p	1,13	0,514
hsa-miR-15b-3p	0,69	0,104	hsa-let-7c-5p	0,86	0,539
hsa-miR-25-3p	0,69	0,107	hsa-let-7d-5p	1,18	0,571
hsa-miR-26b-5p	1,37	0,108	hsa-miR-484	0,91	0,608
hsa-miR-23a-3p	0,71	0,120	hsa-miR-185-5p	1,09	0,656
hsa-miR-16-5p	0,69	0,124	hsa-miR-146a-5p	0,91	0,662
hsa-miR-23b-3p	0,72	0,132	hsa-miR-660-5p	0,90	0,663
hsa-miR-223-3p	0,73	0,145	hsa-miR-181a-5p	0,90	0,666
hsa-miR-30c-5p	0,77	0,149	hsa-miR-222-3p	1,08	0,685
hsa-miR-93-5p	1,33	0,152	hsa-miR-320d	1,09	0,695
hsa-miR-140-3p	0,74	0,154	hsa-miR-191-5p	0,92	0,714
hsa-miR-15b-5p	1,33	0,163	hsa-miR-197-3p	1,09	0,721
hsa-miR-103a-3p	1,46	0,164	hsa-miR-92a-3p	0,93	0,736
hsa-miR-142-3p	1,47	0,166	hsa-miR-423-5p	1,06	0,745
hsa-miR-151a-3p	0,69	0,186	hsa-miR-145-5p	0,94	0,758
hsa-miR-363-3p	1,40	0,186	hsa-miR-320c	0,95	0,775
hsa-let-7g-5p	1,30	0,195	hsa-miR-18a-5p	1,06	0,785
hsa-miR-125a-5p	0,74	0,227	hsa-miR-199a-3p	0,93	0,800
hsa-let-7b-5p	0,80	0,236	hsa-miR-27a-3p	1,06	0,812
UniSp3 IPC	0,76	0,238	hsa-miR-26a-5p	0,95	0,820
hsa-miR-20a-5p	1,25	0,249	hsa-miR-324-3p	1,04	0,841
hsa-miR-652-3p	1,36	0,252	hsa-let-7f-5p	0,96	0,861
hsa-miR-486-5p	0,76	0,269	hsa-miR-151a-5p	1,04	0,895
hsa-miR-192-5p	0,74	0,271	hsa-miR-21-5p	0,99	0,961
hsa-miR-221-3p	1,38	0,283			

ANEXO 10

Fold-change da expressão gênica de todos os miRNA em PBMC 4 semanas após a ingestão diária de 500 mL do suco de laranja sanguínea Moro (n = 8).

miRNA	<i>Fold-change</i>	<i>p</i> valor	miRNA	<i>Fold-change</i>	<i>p</i> valor
hsa-miR-424-5p	1,76	0,0002	hsa-miR-125b-5p	0,91	0,458
hsa-miR-144-3p	1,72	0,003	hsa-miR-210-3p	1,11	0,462
hsa-miR-126-3p	0,61	0,004	hsa-miR-23b-3p	0,92	0,466
hsa-let-7f-5p	0,61	0,005	hsa-miR-30b-5p	0,93	0,484
hsa-miR-27a-3p	1,26	0,043	hsa-miR-107	0,92	0,489
hsa-let-7d-5p	1,20	0,046	hsa-miR-125a-5p	0,95	0,521
hsa-miR-130b-3p	1,26	0,048	hsa-let-7a-5p	0,95	0,547
hsa-miR-103a-3p	0,85	0,064	hsa-miR-30c-5p	0,96	0,573
hsa-miR-142-3p	1,21	0,072	hsa-miR-26a-5p	1,06	0,584
hsa-miR-29b-3p	1,16	0,074	hsa-miR-185-5p	0,94	0,591
hsa-miR-15a-5p	1,20	0,079	hsa-miR-186-5p	1,06	0,604
hsa-miR-128-3p	1,23	0,089	hsa-miR-328-3p	0,96	0,605
hsa-miR-20a-5p	1,16	0,097	hsa-miR-140-5p	1,06	0,621
hsa-miR-155-5p	1,15	0,112	hsa-miR-98-5p	0,93	0,625
hsa-miR-17-5p	1,27	0,114	hsa-miR-342-3p	0,96	0,631
hsa-miR-181a-5p	0,86	0,134	hsa-miR-143-3p	1,08	0,652
hsa-miR-301a-3p	1,25	0,150	hsa-let-7i-5p	0,96	0,677
hsa-miR-221-3p	0,84	0,169	hsa-miR-19a-3p	0,97	0,711
hsa-miR-29c-3p	1,14	0,175	hsa-miR-18b-5p	0,95	0,719
hsa-miR-145-5p	0,81	0,181	hsa-miR-374a-5p	1,06	0,748
hsa-miR-222-3p	0,87	0,191	hsa-let-7b-5p	0,97	0,748
hsa-miR-423-3p	1,10	0,201	hsa-miR-23a-3p	1,03	0,758
hsa-miR-365a-3p	1,18	0,204	hsa-miR-378a-3p	0,97	0,770
hsa-miR-340-5p	1,16	0,231	hsa-miR-27b-3p	0,96	0,794
hsa-miR-486-5p	0,80	0,245	hsa-miR-24-3p	1,02	0,800
hsa-miR-101-3p	1,13	0,251	hsa-let-7e-5p	1,03	0,823
hsa-miR-181b-5p	0,87	0,283	hsa-miR-22-3p	1,03	0,824
hsa-let-7g-5p	0,90	0,314	hsa-miR-30d-5p	0,98	0,832
hsa-miR-31-5p	1,10	0,322	hsa-miR-320a	0,98	0,840
hsa-miR-19b-3p	1,07	0,335	hsa-miR-16-5p	0,98	0,854
hsa-miR-106b-5p	1,09	0,337	hsa-miR-223-3p	1,03	0,865
hsa-miR-150-5p	0,93	0,367	hsa-miR-15b-5p	1,03	0,873
hsa-miR-130a-3p	0,83	0,374	hsa-miR-99a-5p	0,99	0,885
hsa-miR-30e-5p	0,91	0,401	hsa-miR-29a-3p	0,98	0,893
hsa-miR-199a-5p	0,87	0,411	hsa-miR-25-3p	1,01	0,928
hsa-miR-454-3p	1,11	0,418	hsa-miR-146a-5p	0,99	0,939
hsa-let-7c-5p	1,19	0,437	hsa-miR-93-5p	1,00	0,956
hsa-miR-92a-3p	0,94	0,451	hsa-miR-21-5p	1,00	0,969
hsa-miR-26b-5p	1,11	0,452	hsa-miR-451a	0,99	0,987

CURRÍCULO LATTES



Vinícius Cooper Capetini


Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1819877003377241>

ID Lattes: **1819877003377241**

Última atualização do currículo em 18/12/2020

Doutorando em Nutrição em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP), Laboratório de Genômica Nutricional e Inflamação. Integrante do Food Research Center (FoRC), FAPESP. Mestre em Ciências (Fisiologia Humana) pelo Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (2016), sendo a área de concentração de pesquisa Fisiologia Endócrina, com ênfase em secreção de insulina, diabetes e zinco. Pós-graduado em Bases Nutricionais da Atividade Física pela Universidade Estácio de Sá (2015) e em Alimentos Funcionais e Nutrigenômica pela Universidade Gama Filho (2013). Nutricionista pelo Centro Universitário São Camilo (2009). Tem experiência em Nutrição Clínica, Alimentação Escolar e Coletiva e Nutrição Esportiva. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Vinícius Cooper Capetini
Nome em citações bibliográficas	COOPER-CAPETINI, V.;CAPETINI, V. C.;Vinícius Cooper Capetini;COOPER-CAPETINI, VINÍCIUS
Lattes iD	 http://lattes.cnpq.br/1819877003377241

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2017	Doutorado em andamento em Nutrição em Saúde Pública (Conceito CAPES 6). Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, FSP-USP, Brasil. Orientador:  Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero. Palavras-chave: microRNA; Inflamação; Suco de laranja sanguínea; Compostos bioativos; Endotoxemia. Grande área: Ciências da Saúde
2014 - 2016	Mestrado em Fisiologia Humana (Conceito CAPES 6). Instituto de Ciências Biomédicas, USP, ICB - USP, Brasil. Título: Efeito da suplementação com zinco na evolução da resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica em camundongos, Ano de Obtenção: 2016. Orientador:  Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Palavras-chave: Zinco; Diabete melito; Insulina; Resistência à insulina.
2014 - 2015	Especialização em Bases nutricionais da atividade física. (Carga Horária: 360h). Universidade Estácio de Sá, UNESA, Brasil. Título: Micronutrientes e fitoquímicos antioxidantes no exercício. Orientador: Francisco Navarro.
2012 - 2013	Especialização em Alimentos Funcionais e Nutrigenômica. (Carga Horária: 360h). Universidade Gama Filho, UGF, Brasil. Título: Leptina: regulação da ingestão alimentar na obesidade. Orientador: Elke Lima Trigo.
2006 - 2009	Graduação em Nutrição. Centro Universitário São Camilo Espírito Santo, CUSC-ES, Brasil. Título: Alterações no metabolismo da glicose mediante deficiência de zinco e magnésio em portadores de diabetes mellitus. Orientador: Wagner Miranda Barbosa. Bolsista do(a): Centro Universitário São Camilo ES, CUSC, Brasil.



Marcelo Macedo Rogero

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2



Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6607279993080828>

ID Lattes: **6607279993080828**

Última atualização do currículo em 17/03/2021

Graduado em Nutrição pela Universidade de São Paulo (1994), Mestrado em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (2002) e Doutorado em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (2007). Pós-doutorado em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (2007-2008). Pós-doutorado pela Faculdade de Medicina da Universidade de Southampton, Inglaterra (2012-2013). Professor Associado, em Regime de Dedicção Integral à Docência e à Pesquisa, junto ao Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública - USP desde 2009. Coordenador do Programa de Pós-graduação Nutrição em Saúde Pública da FSP-USP (PROEX, nota 6). Coordenador do Laboratório de Genômica Nutricional e Inflamação (GENUIN) da Faculdade de Saúde Pública - USP. É Pesquisador Principal do projeto temático (FAPESP 2017/05125-7) intitulado "Estilo de vida, marcadores bioquímicos e genéticos como fatores de risco cardiometabólico: Inquérito de Saúde na cidade de São Paulo". É Pesquisador Associado do FoRC (Food Research Center), um dos Centros de Inovação, Pesquisa e Difusão (CEPIDs) apoiados pela FAPESP. Professor Pesquisador do projeto intitulado Impact of the omega-3 fatty acid in the homeostasis of adipose tissue and physico-chemical properties and oxidative of lipoproteins: a parallel among experimental model and clinical study referente ao PROGRAMA CAPES/STINT - EDITAL Nº. 075/2013-2014, em parceria com a Universidade de Umea, Suécia. Obteve o primeiro lugar no Prêmio Anual de Excelência em Docência de Graduação na Faculdade de Saúde Pública da USP (2013). Obteve o segundo lugar no Prêmio Excelência em Docência de Graduação da Universidade de São Paulo (2013). Obteve o 1º Prêmio Dra. Eliete Salomon Tudisco, Destaque Profissional do Ano - Nutricionista na Área Acadêmica concedido pelo Conselho Regional de Nutricionistas, 3ª região (CRN-3). Bolsista de Produtividade do CNPq desde 2013. Tem experiência nas áreas de Genômica Nutricional e Inflamação; Imunonutrição; e Metabolismo de Macronutrientes e Exercício Físico. **(Texto informado pelo autor)**


Identificação

Nome	Marcelo Macedo Rogero
Nome em citações bibliográficas	ROGERO, M. M.;ROGERO, MARCELO M.;Rogero, Marcelo Macedo;Rogero, Marcelo M;Rogero, Marcelo;MACEDO ROGERO, MARCELO
Lattes ID	 http://lattes.cnpq.br/6607279993080828
Orcid ID	 https://orcid.org/0000-0003-0517-1645

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. Av. Dr. Arnaldo, 715 Cerqueira Cesar 01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617850 Fax: (11) 30617705
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2003 - 2007	Doutorado em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Efeito do desmame precoce e da suplementação com glutamina, in vitro e in vivo, sobre a funcionalidade de macrófagos peritoniais e o estado nutricional de camundongos, Ano de obtenção: 2007. Orientador:  Julio Orlando Tirapegui Toledo. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
1999 - 2002	Mestrado em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Efeitos do exercício e da suplementação com L-glutamina e L-alanil L-glutamina