



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

**Expressão de microRNA no plasma e suas relações com
biomarcadores cardiometabólicos e dieta em idosos
participantes de estudo de base populacional (ISA Capital)**

Gabrielli Barbosa de Carvalho

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

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero

**São Paulo
2024**

Expressão de microRNA no plasma e suas relações com biomarcadores cardiometabólicos e dieta em idosos participantes de estudo de base populacional (ISA Capital)

Gabrielli Barbosa de Carvalho

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

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero

**Versão revisada
São Paulo
2024**

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

Carvalho, Gabrielli

Expressão de microRNA no plasma e suas relações com biomarcadores cardiometabólicos e dieta em idosos participantes de estudo de base populacional (ISA Capital) / Gabrielli Carvalho; orientador Marcelo Macedo Rogero. -- São Paulo, 2024.

106 p.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2024.

1. MicroRNA circulante. 2. Doenças crônicas não transmissíveis. 3. Síndrome metabólica. 4. Envelhecimento. 5. Consumo alimentar. I. Macedo Rogero, Marcelo, orient. II. Título.

*À minha família, por nunca medirem esforços
para me ajudar a realizar os meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por jamais me deixar fraquejar, desanimar ou desistir. Sei que o meu caminho foi e sempre será por Ele guiado.

À minha família pelo apoio incondicional, especialmente nesses últimos quatro anos. Mudar de estado a fim de perseguir um objetivo não é uma tarefa fácil, e sem o apoio das pessoas que mais amamos ficaria tudo ainda mais difícil. Aos meus pais, Adriana e Valdir, por não medirem esforços em me apoiar nessa jornada, serei eternamente grata a vocês. Às minhas irmãs, Caroline e Juliana, pelas conversas e palavras de incentivo. À minha avó, Amélia, por todo o apoio e carinho de sempre. Seu afeto conseguiu chegar até mim mesmo que de longe. Ao meu noivo, Luan, pela força, incentivo e companheirismo de sempre. Você me apoiou e acompanhou minha vida acadêmica desde o início, e sou muito grata por isso. Amo vocês!

Agradeço à Universidade de São Paulo, por ter sido minha casa durante os últimos quatro anos. Em especial, à Faculdade de Saúde Pública (FSP/USP) pelas oportunidades concedidas e pelos ensinamentos que hoje são parte de quem me tornei.

Agradeço ainda a todos que contribuíram para a realização do estudo ISA-Capital, desde os órgãos financiadores, a Secretaria de Saúde da cidade de São Paulo, a FAPESP e ao CNPq, até os pesquisadores e participantes do estudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero, quem tanto me inspira como pessoa e profissional. Agradeço pelo acolhimento em São Paulo e em seu grupo de pesquisa, GENUIN. Sou extremamente grata por toda a preocupação e zelo com os quais sempre me tratou, por todo o conhecimento compartilhado e pelos ensinamentos que vão além da ciência: respeito, ética e sobre como podemos fazer a diferença na vida das pessoas. Muito obrigada!

À Prof. Dra. Regina Mara Fisberg, quem tanto admiro. Sou muito grata por toda a presteza nos momentos em que precisei e por contribuir imensuravelmente com os resultados deste trabalho. Aproveito para agradecer às suas alunas, Jaqueline e Paula Félix por todo o auxílio com o banco de dados dessa pesquisa. Obrigada!

À Prof. Dra. Flávia Mori Sarti, por todas as contribuições imensuráveis no que diz respeito às primeiras análises dos dados. Todos os seus ensinamentos no início dessa jornada foram de grande importância para que eu começasse a compreender a imensidão dos dados com os quais estive trabalhando durante todo esse tempo. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Sadraque Eneas de Figueiredo Lucena, pelo suporte em algumas das análises estatísticas. Muito obrigada por sempre ser tão solícito em todos os momentos. Suas contribuições foram essenciais para a construção deste trabalho. Gratidão!

Às amigas que encontrei na FSP/USP, Amália, Beatriz e Letícia. Meninas, como sou grata à vida por ter colocado vocês no meu caminho. A nossa parceria começou em meio a atividades acadêmicas e se tornou uma linda amizade, a qual quero levar para sempre comigo. Gratidão pelos momentos vividos, pelas trocas de experiências e pelo apoio nas situações difíceis. A convivência com vocês, sem dúvidas, deixou essa caminhada mais leve. Obrigada!

Agradeço à Paula Brandão e à Tanyara Payolla, pela parceria nessa trajetória e pelas trocas que tanto foram importantes. Obrigada!

Aos amigos que acompanharam todo esse processo e que, mesmo que a distância, sempre me mandaram palavras de apoio e incentivo, em especial, Aline Nascimento, Hanna Machado, Hellyne Marques, Liliane Pires, Luciana Ramos e Maísa Silva. O apoio e amizade de vocês nessa fase foram de grande importância para mim. Obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Bolsa de doutorado – processo nº 2020/03104-5).

RESUMO

CARVALHO, G. B. **Expressão de microRNA no plasma e suas relações com biomarcadores cardiometabólicos e dieta em idosos participantes de estudo de base populacional (ISA Capital)**. 2023. Tese - Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, 2023.

Introdução - O desenvolvimento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) em idosos está relacionado, dentre outros fatores, à desregulação da expressão de microRNAs (miRNAs), a qual pode ser modulada por fatores ambientais, incluindo o padrão alimentar. **Objetivo** - Avaliar o perfil de expressão plasmática de miRNAs e suas relações com biomarcadores cardiometabólicos e dieta em idosos do estudo de base populacional ISA Capital. **Métodos** - Estudo transversal, com subamostra de 200 indivíduos idosos participantes do ISA Nutrição. Foi avaliado o perfil de expressão de 21 miRNAs plasmáticos. Os indivíduos foram avaliados quanto às medidas antropométricas e à pressão arterial sistêmica; biomarcadores glicêmicos, do perfil lipídico e inflamatórios; e ao consumo alimentar. Calculou-se o escore de inflamação crônica e de baixo grau (SIS) a partir das concentrações de 10 biomarcadores inflamatórios. A expressão plasmática dos miRNAs circulantes foi analisada a partir do método Fluidigm. Os indivíduos avaliados foram distribuídos em dois grupos de acordo com a presença ou não de síndrome metabólica (SM), e o teste ajustado de Wald foi utilizado para comparar a expressão dos miRNAs entre os grupos. A partir do coeficiente tau-a de Kendall estimou-se as correlações entre a expressão dos miRNAs e variáveis de interesse. O teste de Wilcoxon-Mann-Whitney foi utilizado para determinar as diferenças no SIS em indivíduos de acordo com o sexo e a presença de SM. O teste de correlação de Spearman estimou as correlações entre o SIS, concentrações de leptina, miRNAs e demais variáveis de interesse. Além disso, utilizou-se modelos lineares generalizados (MLGs) para aprofundar as associações encontradas. As análises foram realizadas nos *softwares* Stata/SE (versão 17.0) e R (versão 4.2.3), considerando nível de significância de 0,05. **Resultados** - A amostra final deste estudo consistiu em 193 indivíduos (69,1 (0,5) anos), sendo 50,4% do sexo feminino, e 64,7% com SM. A expressão plasmática dos miR-30a e miR-122 foi maior em indivíduos com SM do que naqueles sem SM, e sua expressão se correlacionou à glicemia e insulinemia em jejum, HOMA1-IR, HDL-c, VLDL-c, LDL-c, colesterol não-HDL e triacilgliceróis. Além disso, associações negativas entre cinco miRNAs (miR-15a, miR-16, miR-223, miR-363, miR-532), concentração de leptina e/ou SIS foram observadas. Ainda, o consumo de diversos grupos alimentares influenciou a expressão plasmática dos miRNAs. O consumo diário de 100 g de frutas se relacionou à redução na expressão dos miR-16, miR-30a, miR-126, miR-130b, miR-363, miR-375, miR-486 e miR-532. Contudo, o consumo de carne vermelha se associou ao aumento na expressão plasmática de quatro miRNAs (miR-126, miR-150, miR-223 e miR-376a). Ainda, observou-se que o consumo diário de 100 g de hortaliças se associou a uma chance 7 vezes maior de os indivíduos avaliados não apresentarem SM. **Conclusões** - O aumento da expressão plasmática dos miR-21, miR-30a e miR-122 sugere maior risco cardiometabólico, ao passo que a redução na expressão dos miR-15a, miR-16, miR-223, miR-363 e miR-532 sugere menor risco cardiometabólico em idosos. Ainda, os resultados encontrados enfatizam a importância da adoção de hábitos alimentares saudáveis na regulação da expressão dos miRNAs e, consequentemente, na redução do risco de desenvolvimento de DCNT.

Descritores: MicroRNA circulante; Doenças crônicas não transmissíveis; Síndrome metabólica; Envelhecimento; Consumo alimentar.

ABSTRACT

CARVALHO, G. B. [Plasma microRNA expression and its associations with cardiometabolic biomarkers, and diet in elderly participants of a population-based study (ISA Capital)]. 2023. Thesis – Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, 2023.

Introduction: The development of noncommunicable diseases (NCD) in older adults is related, among other factors, to the dysregulation of microRNAs (miRNAs) expression, which can be modulated by environmental factors, including dietary patterns. **Objectives:** To assess the plasma expression profile of miRNAs and its relationships with cardiometabolic biomarkers and diet of older adults participating in the ISA Capital population-based study. **Methods:** Cross-sectional study, with a sub-sample of 200 older adults participating in ISA Nutrition. The expression profile of 21 plasma miRNAs was evaluated. Subjects were evaluated for anthropometric measurements and systemic blood pressure; glycemic, lipid and inflammatory biomarkers; and food consumption. Furthermore, the chronic and low-grade inflammation score (SIS) was calculated based on the concentrations of 10 inflammatory biomarkers. The plasma expression of circulating miRNAs was analyzed using the Fluidigm method. The evaluated individuals were distributed into two groups according to the presence or absence of metabolic syndrome (MetS), and the adjusted Wald test was used to compare the expression of miRNAs between the groups. Using Kendall's tau-a coefficient, correlations between miRNAs expression and variables of interest were estimated. The Wilcoxon-Mann-Whitney test was used to determine differences in SIS based on the distribution of individuals according to sex and the presence of MetS. The Spearman correlation test estimated correlations between SIS, leptin concentrations, miRNAs and other variables of interest. Furthermore, generalized linear models were used to deepen the associations found. All analyzes were performed using Stata/SE (version 17.0) and R (version 4.2.3) software, considering a significance level of 0.05. **Results:** The final sample of this study consisted of 193 individuals, (69.1 (0.5) years), 50.4% of whom were female, and 64.7% with MetS. Plasma expression of miR-30a and miR-122 was higher in individuals with MetS than in those without MetS, and their expression correlated with fasting glycemia and insulinemia, HOMA1-IR, HDL-c, VLDL-c, LDL-c, non-HDL cholesterol and triacylglycerols. Furthermore, negative associations between five miRNAs (miR-15a, miR-16, miR-223, miR-363, miR-532), leptin concentration and/or SIS were observed. In addition, the consumption of different food groups influenced the plasma expression of miRNAs. Daily consumption of 100 g of fruits was related to a reduction in the expression of miR-16, miR-30a, miR-126, miR-130b, miR-363, miR-375, miR-486, miR-532. On the other hand, red meat consumption was associated with an increase in the plasma expression of four miRNAs (miR-126, miR-150, miR-223 and miR-376a). Furthermore, it was observed that the daily consumption of 100 g of vegetables was associated with a 7 times greater chance of the individuals evaluated not having MetS. **Conclusions:** The increase in the plasma expression of miR-21, miR-30a and miR-122 suggests a greater cardiometabolic risk, while the reduction in the expression of miR-15a, miR-16, miR-223, miR-363 and miR-532 suggests lower cardiometabolic risk in the elderly. Furthermore, the results found emphasize the importance of adopting healthy eating habits in regulating the expression of miRNAs and, consequently, in reducing the risk of developing NCD.

Descriptors: Circulating microRNA; Chronic non-communicable diseases; Metabolic syndrome; Aging; Food consumption.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Os marcadores de longevidade	12
Figura 2 – Etapas da seleção da subamostra do presente estudo	35
Figura 3 - Expressão plasmática de miR-30a e miR-122 em idosos de acordo com diagnóstico de síndrome metabólica (n=193)	38
Figura 4 - Como os miRNAs e suas relações com o SIS e com as concentrações de leptina podem impactar o desenvolvimento da síndrome metabólica em idosos	43
Figura 5 – Representação gráfica das principais associações encontradas entre os grupos alimentares e os miRNAs avaliados no presente estudo	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios para classificação de Síndrome Metabólica nos indivíduos avaliados	27
Tabela 2 – MiRNAs avaliados no plasma de humanos relacionados ao excesso de peso, obesidade, à resposta inflamatória e ao metabolismo da glicose e de lipídios	30
Tabela 3 - Componentes dos grupos alimentares de risco e de proteção para doenças cardiometabólicas	32
Tabela 4 - Caracterização dos indivíduos participantes do estudo de base populacional ISA-Nutrição (n = 193)	36
Tabela 5 - Expressão plasmática dos 21 miRNAs estudados nos indivíduos avaliados	36
Tabela 6 - Caracterização da subamostra dos idosos participantes do estudo de base populacional ISA-Nutrição, de acordo com a presença de síndrome metabólica (n = 193)	37
Tabela 7 - Correlações entre miRNAs e variáveis antropométricas, glicêmicas, lipídicas e pressão arterial em idosos participantes do estudo de base populacional ISA Nutrição (n=193)	39
Tabela 8 - Associações entre Escore de Inflamação Sistêmica de Baixo Grau (SIS) e concentração plasmática de leptina com variáveis de saúde em 193 idosos participantes do estudo de base populacional ISA-Nutrição	41
Tabela 9 - Resultados dos modelos lineares generalizados (MLGs) para a expressão dos miRNAs, concentrações de leptina e escore de inflamação sistêmica de baixo grau (SIS)	43
Tabela 10 - Consumo mediano (mín–máx) dos componentes alimentares estudados pelos idosos participantes do estudo de base populacional ISA-Nutrição	44
Tabela 11 - Resultados dos modelos lineares generalizados (MLGs) para a expressão dos miRNAs e consumo dos componentes alimentares	45
Tabela 12 - Resultados dos modelos lineares generalizados (MLGs) ajustados para a presença da síndrome metabólica	46
Tabela 13 - Resultados dos modelos lineares generalizados (MLGs) ajustados para a presença da síndrome metabólica	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 ASPECTOS DO ENVELHECIMENTO	11
1.2 miRNAS	16
1.3 miRNAS CIRCULANTES E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS (DCNT)	18
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 MÉTODOS	25
3.1 AMOSTRAGEM ISA NUTRIÇÃO 2015	25
3.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO	26
3.3 COLETA DE DADOS	26
3.3.1 Dados antropométricos e pressão arterial.....	26
3.3.2 Material biológico	27
3.3.3 Dados dietéticos	28
3.4 DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES GLICÊMICOS E LIPÍDICOS	28
3.5 DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS	29
3.6 EXPRESSÃO DE miRNAS	29
3.7 CÁLCULO DO ESCORE DE INFLAMAÇÃO SISTÊMICA DE BAIXO GRAU (SIS)	31
3.8 AVALIAÇÃO DOS GRUPOS ALIMENTARES.....	32
3.9 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA	33
3.10 ASPECTOS ÉTICOS	33
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4 RESULTADOS	34
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXO 1 - Parecer Consubstanciado de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo	79
ANEXO 2 – Artigo 1 publicado	84
ANEXO 3 – Artigo 2 publicado	90
CURRÍCULO LATTES	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS DO ENVELHECIMENTO

A longevidade no Brasil e no mundo vem aumentando ao longo do tempo. A expectativa de vida é a principal métrica para avaliação da saúde da população, a qual sofre alterações com o passar das décadas. Desde 1900, quando a expectativa de vida global era de 30 anos, essa métrica mais que dobrou em relação a 2019, com uma esperança de vida global de 70 anos, sendo que os países com a menor e a maior expectativa de vida são República Centro-Africana (53 anos) e Japão (83 anos), respectivamente. Países mais desenvolvidos como Espanha, Suíça, Itália, Austrália e Japão são aqueles que apresentam maior expectativa de vida, estando na faixa de 80 anos. Por outro lado, países menos desenvolvidos são aqueles com menor expectativa de vida (50 a 60 anos) (ROSER, ORTIZ-OSPINA e RITCHIE, 2013).

No contexto do Brasil, essa métrica também vem sofrendo mudanças. No ano de 1940, a expectativa de vida no Brasil era de 45,5 anos. Em 2019, este número subiu consideravelmente para 76,6 anos. Entre as unidades de federação, a maior expectativa de vida foi observada em Santa Catarina (79,9 anos), com 3,3 anos acima da média nacional. Por outro lado, a menor expectativa de vida foi observada no Maranhão (71,4 anos), com 5,2 anos abaixo da média nacional. Além disso, a probabilidade de um indivíduo de 60 anos atingir os 80 anos era de 344 por mil em 1940, passando para 604 por mil em 2019 (BRASIL, 2020a; 2020b).

O envelhecimento caracteriza-se por uma perda progressiva da integridade fisiológica, podendo acarretar em comprometimento da função e maior vulnerabilidade à morte (GEMS e PATRIDGE, 2013; LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013). Tal perda é o principal fator de risco para doenças, incluindo câncer, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Estudos têm evidenciado que o envelhecimento é controlado, em parte, por vias genéticas e por processos bioquímicos conservados na evolução (BARZILAI *et al.*, 2012; FONTANA *et al.*, 2010; KENYON, 2010; LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013).

Nesse cenário, nove marcadores de longevidade têm sido investigados, os quais representam denominadores comuns do envelhecimento em diferentes organismos, com ênfase especial no envelhecimento de mamíferos (GEMS e PATRIDGE, 2013; KENYON, 2010; LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013). Esses marcadores de longevidade são: instabilidade genômica, desgaste dos telômeros, alterações epigenéticas, perda de proteostase, desregulação de sensores

de nutrientes, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão de células-tronco e comunicação intercelular alterada (Figura 1) (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013).

Figura 1 – Os marcadores de longevidade.



Fonte: LÓPEZ-OTÍN *et al.* (2013, p. 1195).

No contexto da instabilidade genômica, sabe-se que um denominador comum de envelhecimento é o acúmulo de danos genéticos ao longo da vida (MOSKALEV *et al.*, 2012). Agentes físicos, químicos e biológicos exógenos podem prejudicar a integridade e estabilidade do DNA. Ademais, fatores endógenos (erros de replicação de DNA, reações hidrolíticas espontâneas e estresse oxidativo) também interferem na integridade do DNA (HOEIJMAKERS, 2009). As alterações genéticas decorrentes de danos extrínsecos ou intrínsecos são altamente diversificadas e incluem mutações pontuais, translocações, ganhos e perdas cromossômicas, encurtamento dos telômeros e interrupção do gene causada pela integração de vírus ou *transposons* (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013).

O desgaste dos telômeros também é considerado um marcador de longevidade do envelhecimento. Algumas regiões cromossômicas, especialmente os telômeros, são mais suscetíveis à alteração relacionada à idade, proveniente do acúmulo de danos ao DNA (BLACKBURN *et al.*, 2006). As DNA polimerases de replicação não têm a capacidade de

replicar completamente as extremidades terminais das moléculas lineares de DNA, uma vez que esta função é propriedade de uma DNA polimerase especializada conhecida como telomerase. No entanto, a maioria das células somáticas de mamíferos não expressa a telomerase, acarretando perda progressiva das sequências protetoras dos telômeros presentes nas extremidades dos cromossomos (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013). Os telômeros são ligados por um complexo multiproteico característico conhecido como *shelterin* (PALM e DE LANGE, 2008). Uma das principais funções desse complexo é impedir o acesso das proteínas de reparo do DNA aos telômeros. Caso contrário, os telômeros seriam "reparados" como "quebras de DNA" acarretando em fusões de cromossomos. Devido a este reparo restrito, o dano ao DNA nos telômeros é notavelmente persistente e altamente eficiente na indução de senescência e/ou apoptose celular (FUMAGALLI *et al.*, 2012; HEWITT *et al.*, 2012).

Estudos realizados em modelos animais geneticamente modificados demonstraram ligações causais entre perda de telômeros, senescência celular e o envelhecimento do organismo, indicando que camundongos com telômeros encurtados ou alongados exibiram expectativa de vida diminuída ou aumentada, respectivamente (ARMANIOS *et al.*, 2009; TOMÁS-LOBA *et al.*, 2008). Em humanos, meta-análise recente encontrou forte relação entre telômeros curtos e risco de mortalidade, no entanto, particularmente em idades mais jovens (BOONEKAMP *et al.*, 2013). Dessa forma, o envelhecimento é acompanhado pelo desgaste dos telômeros.

Uma variedade de alterações epigenéticas afeta todas as células e tecidos ao longo da vida (TALENS *et al.*, 2012). As mudanças epigenéticas envolvem alterações nos padrões de metilação do DNA, modificação pós-tradução de histonas e remodelamento da cromatina. A acetilação da histona H4K16, a trimetilação da H4K20 ou a trimetilação da H3K4 constituem marcas epigenéticas associadas ao envelhecimento (FRAGA e ESTELLER, 2007; HAN e BRUNET, 2012). Os múltiplos sistemas enzimáticos que garantem a geração e manutenção de padrões epigenéticos incluem DNA metiltransferases, histona acetilases, desacetilases, metilases e desmetilases, bem como complexos de proteínas implicados na remodelação da cromatina (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013).

O envelhecimento e algumas doenças relacionadas ao envelhecimento estão ligados à homeostase proteica ou proteostase (POWERS *et al.*, 2009). Todas as células aproveitam uma série de mecanismos de controle de qualidade para preservar a estabilidade e a funcionalidade de seus proteomas. A proteostase envolve mecanismos para a estabilização de proteínas corretamente enoveladas e mecanismos para a degradação de proteínas pelo proteassoma ou lisossomos (HARTL *et al.*, 2011; KOGA *et al.*, 2011; MIZUSHIMA *et al.*, 2008). Além disso,

existem reguladores de proteotoxicidade relacionada à idade, como o MOAG-4, que atuam por meio de uma via alternativa distinta das chaperonas moleculares e proteases (VAN HAM *et al.*, 2010). Todos esses sistemas funcionam de forma coordenada para restaurar a estrutura dos polipeptídeos mal enovelados ou para removê-los e degradá-los completamente, evitando assim o acúmulo de proteínas não funcionais e garantindo a renovação contínua das proteínas intracelulares. Nesse sentido, tem se observado que a proteostase é alterada com o envelhecimento (KOGA *et al.*, 2011). Além disso, a expressão crônica de proteínas mal enoveladas ou agregadas contribui para o desenvolvimento de doenças relacionadas à idade, como doença de Alzheimer e doença de Parkinson (POWERS *et al.*, 2009).

No que diz respeito à desregulação de sensores de nutrientes, destaca-se a via de “sinalização de insulina e do *Insulin-like Growth Factor 1* (Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 - IGF-1)”. Esta via é responsável por informar às células acerca da presença de glicose (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013). Esta via é considerada de controle do envelhecimento, sendo que seus principais alvos são os fatores de transcrição da família *forkhead box* (FOXO) e o complexo mTOR, ambos também envolvidos no envelhecimento (BARZILAI *et al.*, 2012; FONTANA *et al.*, 2010; KENYON, 2010). Além disso, polimorfismos genéticos ou mutações que reduzem as funções dos receptores de IGF-1 e de insulina, da mTOR e do FOXO foram associados à longevidade em humanos, ratificando o grande impacto destas vias na longevidade (BARZILAI *et al.*, 2012; FONTANA *et al.*, 2010; KENYON, 2010).

Conforme as células e o organismo envelhecem, a eficácia da cadeia respiratória tende a diminuir, aumentando o escape de elétrons e reduzindo a geração de ATP (GREEN *et al.*, 2011). A teoria do envelhecimento relacionada ao estresse oxidativo propõe que a disfunção mitocondrial progressiva que ocorre com o envelhecimento resulta no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, que, por sua vez, causa deterioração mitocondrial adicional e dano celular (HARMAN, 1965). Por outro lado, mitocôndrias disfuncionais podem contribuir para o envelhecimento independentemente do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EDGAR *et al.*, 2009; HIONA *et al.*, 2010), uma vez que a disfunção mitocondrial influencia a sinalização apoptótica (KROEMER *et al.*, 2007), bem como desencadeia aumento da resposta inflamatória ao favorecer a ativação mediada por espécies reativas de oxigênio (GREEN *et al.*, 2011). Assim, a função mitocondrial tem impacto profundo no processo de envelhecimento, sendo que sua disfunção pode acelerar o processo de envelhecimento.

No tocante à senescência celular destaca-se a ocorrência do encurtamento dos telômeros (BODNAR *et al.*, 1998), danos não teloméricos ao DNA e a desrepressão do *locus* INK4/ARF, os quais ocorrem progressivamente com o envelhecimento (COLLADO *et al.*, 2007). Assim, o

acúmulo de células senescentes com o envelhecimento pode refletir um aumento na taxa de geração dessas células (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013). Como o número de células senescentes aumenta com o envelhecimento, é amplamente aceito que a senescência contribui para o envelhecimento. No entanto, essa visão desconsidera o objetivo principal da senescência, que é impedir a propagação de células danificadas e desencadear sua morte pelo sistema imunológico. Portanto, é possível que a senescência seja uma resposta compensatória benéfica que contribua para livrar os tecidos de células danificadas e potencialmente oncogênicas (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013).

O declínio do potencial regenerativo dos tecidos é uma das características mais evidentes do envelhecimento. Por exemplo, a hemopoese diminui com a idade, resultando em redução da produção de células imunes adaptativas (imunosenescência) (SHAW *et al.*, 2010). Estudos em camundongos idosos revelaram diminuição geral da atividade do ciclo celular de células-tronco hematopoiéticas, sendo que as mais velhas passavam por menos divisões celulares do que as mais jovens (ROSSI *et al.*, 2007). Isso se relaciona com o acúmulo de danos ao DNA (ROSSI *et al.*, 2007) e com a maior expressão de proteínas inibidoras do ciclo celular (JANZEN *et al.*, 2006). O encurtamento do telômero também é uma causa importante do declínio das células-tronco com o envelhecimento em vários tecidos (FLORES *et al.*, 2005; SHARPLESS e DEPINHO, 2007).

Por fim, além das alterações autônomas das células, o envelhecimento também envolve mudanças no nível da comunicação intercelular, seja endócrina, neuroendócrina ou neuronal (LAPLANTE e SABATINI, 2012; RANDO e CHANG, 2012; ZHANG *et al.*, 2013). Assim, a sinalização neuro-hormonal (por exemplo, renina-angiotensina, sinalização de insulina-IGF-1) tende a ser desregulada no envelhecimento à medida que as reações inflamatórias aumentam e a imunocompetência contra patógenos e células pré-malignas diminui (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013).

Os marcadores da longevidade discutidos acima estão fortemente interligados e convergem para a inflamação, uma vez que o comprometimento de qualquer um dos marcadores está relacionado à inflamação e, conseqüentemente, afeta todos os outros pilares (FRANCESCHI *et al.*, 2018). A esta situação de inflamação sistêmica, crônica e de baixo grau — que ocorre na ausência de infecção, causada principalmente por sinais endógenos — e que acontece no envelhecimento, atribui-se o termo “*inflammaging*” (FRANCESCHI *et al.*, 2018). Vários mecanismos celulares e moleculares estão envolvidos na *inflammaging*, incluindo senescência celular, disfunção mitocondrial, autofagia e mitofagia defeituosa, ativação do

inflamassoma, desregulação do sistema ubiquitina-proteassoma, ativação da resposta ao dano do DNA e disbiose intestinal (VITALE, SALVIOLI e FRANCESCHI, 2013).

Nesse sentido, as novas perspectivas da gerociência, incluindo a categorização de nove marcadores da longevidade, têm sido úteis para a contextualização de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) na longevidade. Sabe-se que em indivíduos longevos, as DCNT mais comuns são a hipertensão arterial sistêmica (HAS) e o diabetes tipo 2, as quais juntas são consideradas como os principais fatores de risco para o desenvolvimento de complicações renais, cerebrovasculares e cardiovasculares (BRASIL, 2011a; DUNCAN *et al.*, 2012). Ademais, alguns fatores de risco para o desenvolvimento de DCNT já estão bem estabelecidos na literatura: dieta não saudável, tabagismo, uso nocivo de álcool e sedentarismo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Em adição a isso, os microRNAs (miRNAs) plasmáticos são considerados potenciais biomarcadores preditores do risco de desenvolvimento de DCNT, uma vez que apresentam padrões de expressão distintos em diferentes condições clínicas (ORTEGA *et al.*, 2013; RONG *et al.*, 2013; SIMIONESCU *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2013).

1.2 miRNAS

Os miRNAs são pequenas moléculas não-codificantes de fita simples de RNA, de 18 a 25 nucleotídeos, que estão envolvidos na regulação celular e genômica, pois se ligam a uma sequência de bases localizadas na região não traduzida 3' (3'UTR) de um RNA mensageiro (mRNA), induzindo sua clivagem e, quando não perfeitamente emparelhados à região 3'UTR, favorecem o bloqueio da tradução de proteínas (ABDELLATIF, 2012; CRUZ *et al.*, 2017; MA *et al.*, 2011; ORTEGA *et al.*, 2013). Os miRNAs podem estar presentes em fluidos corporais e em todos os tecidos, assim como em vesículas (exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos) ou combinados a diversas proteínas (argonautas – AGO, lipoproteínas de baixa e alta densidade – LDL e HDL e nucleofosmina 1 – NPM1) (CRUZ *et al.*, 2017; QUINTANILHA *et al.*, 2017).

O mecanismo de ação dos miRNAs ocorre mediante seu pareamento parcial ou total com o mRNA alvo. Esse pareamento ocorre entre as bases nitrogenadas da região “seed” (2 a 8 nucleotídeos na região 5' do miRNA) e região 3' não traduzida (3'UTR) de um mRNA alvo. Essa interação pode acarretar o processo de desadenilação (remoção da cauda poli A), do mesmo modo que pode interferir na estrutura da cromatina, rearranjo cromossomal e no processo de metilação de DNA ou de histonas (IFTIKHAR e CARNEY, 2016a; O'BRIEN *et al.*, 2018). Um único miRNA pode interagir com diversos alvos, sendo essa característica

regulada pela sequência “*seed*”, a qual é responsável por definir a função e a especificidade do miRNA (O’BRIEN *et al.*, 2018).

No meio intracelular, os miRNAs podem modular a expressão gênica, por meio da regulação de vias de sinalização (IFTIKHAR e CARNEY, 2016a; O’BRIEN *et al.*, 2018). Além disso, três possíveis mecanismos são descritos na literatura para a liberação dos miRNAs do meio extracelular: a) liberação passiva pelas células em decorrência de lesão tecidual, inflamação crônica, apoptose ou necrose celular; b) secreção ativa via vesículas celulares, incluindo exossomos, L-exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos, sendo que os miRNAs associados a vesículas podem ser captados por diferentes tipos celulares, possivelmente, por meio de fagocitose, endocitose ou fusão direta com a membrana plasmática e, desse modo, regular a expressão gênica nessas células; c) secreção ativa dos miRNAs mediante formação de complexos com lipoproteínas e proteínas de ligação a RNA, livre de microvesículas (CHEN *et al.*, 2012; IFTIKHAR e CARNEY, 2016a).

Os miRNAs ligados às proteínas podem ser captados por receptores específicos localizados na membrana celular. A exemplo disso, tem se observado que a HDL é capaz de se associar a miRNAs exógenos, podendo direcioná-los a diferentes tipos celulares (CHEN *et al.*, 2012; IFTIKHAR e CARNEY, 2016b; VICKERS *et al.*, 2011). Além disso, estudos têm mostrado que grande parte dos miRNAs circulantes no plasma não está encapsulada em microvesículas, mas sim associadas a proteínas de ligação ao RNA, como a Argonauta-2 (AGO2) (ARROYO *et al.*, 2011; TURCHINOVICH *et al.*, 2011) e a NPM1 (WANG *et al.*, 2010). Evidências apontam ainda interação direta de miRNAs a receptores, em especial, os receptores do tipo Toll, os quais apresentam papel relevante na ativação de vias de sinalização envolvidas com a resposta inflamatória (BAYRAKTAR, VAN ROOSBROECK e CALIN, 2017; FABBRI, 2017; IFTIKHAR e CARNEY, 2016b).

Os miRNAs estão envolvidos em diversos mecanismos moleculares, participando principalmente da regulação e diferenciação de adipócitos e síntese de citocinas pró-inflamatórias e de proteínas sinalizadoras da via da insulina (CRUZ *et al.*, 2017; HULSMANS, KEYZER e HOLVOET, 2011). Nesse contexto, constata-se que os miRNAs desempenham papéis-chave em vários processos biológicos, desde o desenvolvimento e metabolismo até a apoptose e as vias de sinalização, tornando-os assim importante foco de pesquisas científicas em DCNT (AMBROS, 2004; BARTEL, 2004; OSELLA *et al.*, 2014). Cabe destacar que os miRNAs circulantes têm sido associados aos distúrbios metabólicos presentes em indivíduos com obesidade, como a inflamação crônica de baixo grau e a resistência à ação da insulina (HENEGHAN, MILLER e KERIN, 2010; HULSMANS, KEYZER e HOLVOET, 2011).

1.3 miRNAS CIRCULANTES E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS (DCNT)

As DCNT são as principais causas de mortalidade em todo o mundo, e um dos principais desafios do século XXI, sendo responsáveis por 71% dos 57 milhões de óbitos ocorridos mundialmente. As doenças cardiovasculares (DCV) (31%), cânceres (16%), doenças respiratórias crônicas (7%) e o diabetes (3%) são as principais DCNT responsáveis por essas mortes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). No Brasil, as DCNT também apresentam relevância, mostrando-se em 2016 responsáveis por 74% do total de mortes no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

O surgimento das principais DCNT está ligado a fatores de risco comportamentais — tabagismo, alcoolismo, sedentarismo e alimentação não-saudável — e a alterações metabólicas/fisiológicas — elevação na pressão arterial, sobrepeso/obesidade, hiperglicemia e hiperlipidemia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Além disso, tem se observado que a desregulação na expressão de miRNAs apresenta papel no desenvolvimento de diversas doenças (ABDELLATIF, 2012). A exemplo disso, alterações na expressão de miRNAs mostraram-se presentes em indivíduos com obesidade, reafirmando a sua contribuição para a manifestação desses distúrbios (MA *et al.*, 2011; ORTEGA *et al.*, 2013).

Levando-se em consideração que a obesidade está associada a diversos distúrbios metabólicos importantes como a inflamação crônica de baixo grau e resistência à insulina (CRUZ *et al.*, 2014; MOLICA *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015), estudos realizados em indivíduos com obesidade têm mostrado diferentes resultados. Alterações na expressão sérica do miR-21 foram encontradas em um estudo realizado numa amostra contendo indivíduos idosos com obesidade. Este miRNA apresentou expressão sérica reduzida nos idosos com obesidade quando comparados aos não-obesos, mostrando ainda correlações negativas com biomarcadores do controle glicêmico (insulina sérica e HOMA-IR), concentração sérica de colesterol total, IMC e CC; e correlação positiva com a concentração sérica de HDL-c (GHORBANI *et al.*, 2018; MAHDAVI *et al.*, 2018).

Em contrapartida, Simionescu *et al.* (2014) verificaram elevada expressão sérica do miR-21 em idosos com dislipidemia e hiperglicemia em relação a indivíduos sem alterações no perfil lipídico e glicêmico, bem como correlações positivas com biomarcadores do perfil lipídico (colesterol total, triacilgliceróis e LDL-c) e inflamatórios (proteína C reativa – PCR e IL-1 β) (SIMIONESCU *et al.*, 2014). Ainda, estudos apontaram a relação dos miR-16, miR-107, miR-150 e miR-152 com a circunferência da cintura, concentração de lipídios séricos e sensibilidade à insulina (MA *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2015).

Semelhantemente, Pescador *et al.* (2013) analisaram o perfil de expressão sérico de miRNAs em indivíduos com obesidade e verificaram elevada expressão do miR-138, miR-15b e miR-376a, demonstrando o potencial desses miRNAs na obesidade. Associado a isso, Ortega *et al.* (2013) verificaram reversão na expressão de miRNAs induzidos pela obesidade após os indivíduos com obesidade terem sido submetidos à cirurgia bariátrica; resultado este que não foi observado após o tratamento somente com dieta hipocalórica.

Os depósitos de gordura corporal são compostos por dois tipos de tecido adiposo. O tecido adiposo branco armazena energia na forma de triacilgliceróis e está relacionado à inflamação crônica e estresse oxidativo, enquanto o tecido adiposo marrom dissipa a energia na forma de calor, por meio da proteína desacopladora 1 (UCP1) (KAJIMURA e SAITO, 2014; LEE, WU e FRIED, 2013; OUELLET *et al.*, 2012; ROSELL *et al.*, 2014). É importante ressaltar que, no tecido adiposo de indivíduos com obesidade, a expressão de miRNAs é alterada, sendo estas alterações influenciadas pelo tipo de tecido adiposo. Nesse sentido, Oger *et al.* (2014) avaliaram a expressão de miRNAs no tecido adiposo, fígado e músculo esquelético de ratos obesos e confirmaram — apenas no tecido adiposo branco desses animais — a regulação negativa de miR-200a e miR-200b e aumento da expressão de miR-342-3p e miR-335-5p.

No contexto das doenças cardiovasculares, a expressão do miR-21 circulante foi utilizada para identificar pacientes com fibrose induzida por estenose aórtica (VILLAR *et al.*, 2013) e infarto agudo do miocárdio (ZHANG *et al.*, 2016). Ainda, Hijmans *et al.* (2018) mostraram que este miRNA apresentou-se *downregulated* em idosos com hipertensão arterial em relação a indivíduos normotensos, e que este miRNA mostrou, ainda, correlação negativa com os valores de pressão arterial sistólica desses indivíduos, demonstrando a utilidade potencial do miR-21 como um biomarcador diagnóstico para fibrose e doenças cardíacas.

Além disso, Wu *et al.* (2015) verificaram expressão de miRNAs alterada em indivíduos com obesidade e diabetes tipo 2. Foram verificadas elevada expressão do miR-152 e reduzida expressão do miR-138, os quais estão envolvidos na fisiopatologia da resistência à insulina e inflamação em indivíduos com obesidade. Observou-se ainda reduzida expressão plasmática do miR-593 nos indivíduos avaliados. De maneira semelhante, o miR-126 apresentou reduzida expressão plasmática em indivíduos idosos com obesidade e diabetes tipo 2 quando comparados àqueles sem obesidade e diabetes tipo 2. Foram vistas ainda correlações negativas entre a expressão plasmática deste miRNA e biomarcadores do controle glicêmico (glicemia em jejum e percentual de hemoglobina glicada) (ORTEGA *et al.*, 2014).

No contexto do diabetes, os miRNAs atuam nos mecanismos de resistência à insulina. Ortega *et al.* (2014) mostraram expressão plasmática aumentada do miR-222 em indivíduos com diabetes tipo 2, e esses valores correlacionaram-se positivamente com a glicemia em jejum e o percentual de hemoglobina glicada. Assim como o miR-222, o miR-320 também participa de mecanismos relacionados à resistência à insulina na obesidade. Nesse contexto, Ling *et al.* (2009) mostraram que os adipócitos resistentes à insulina apresentaram expressão aumentada de miR-320, e que esse miRNA inibiu a expressão da subunidade p85 da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), inibindo a via de sinalização da insulina. Ademais, Tang *et al.* (2012) mostraram que o miR-320 pode regular a glicólise a partir da inibição da fosfofrutoquinase, enzima reguladora da via glicolítica.

Hooten *et al.* (2013) traçaram o perfil sérico de miRNAs em idosos (idade média de 64,6 anos) e adultos jovens (idade média de 30,5 anos). Foi verificado que os miR-181a-5p, miR-1248 e miR-151a-3p apresentavam redução da sua expressão com a idade (HOOTEN *et al.*, 2013). Sabe-se que a longevidade está relacionada ao desenvolvimento de diversas condições clínicas como, por exemplo, a sarcopenia. As expressões plasmáticas de miR-155, miR-208b, miR-222, miR-210, miR-328 e miR-499 foram significativamente *downregulated* nos indivíduos com sarcopenia em relação àqueles sem sarcopenia (HE *et al.*, 2020). Além de ser relacionada a consequências adversas como quedas, declínio funcional, fragilidade e mortalidade (BJORKMAN *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2019), a sarcopenia também se caracteriza pela redução da quantidade de tecido metabolicamente ativo. Dessa forma, esta condição aumenta o risco de doenças metabólicas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, hipertensão e dislipidemia (BIOLO *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2018; YILMAZ e BAHAT, 2019).

Diante do exposto, diversos estudos mostraram associações entre a expressão de miRNAs circulantes e condições clínicas presentes em indivíduos longevos. Em adição, estudos têm mostrado que a expressão de miRNAs também pode ser regulada por fatores ambientais e alimentares (VRIJENS, BOLLATI e NAWROT, 2015; TILI *et al.*, 2010; ORTEGA *et al.*, 2015). Diversos estudos mostraram que os miRNAs podem ser regulados pela alimentação ou mesmo por nutrientes isolados ou compostos bioativos, indicando assim que a manipulação da dieta representa importante abordagem terapêutica para modular o risco de DCNT (KRONSKI *et al.*, 2014; ORTEGA *et al.*, 2015; RASHEED, RASHEED e AL-SHAYA, 2017).

1.4 EXPRESSÃO DE MIRNAS, ESTILO DE VIDA E PADRÃO ALIMENTAR

Fatores dietéticos estão relacionados a alterações epigenéticas presentes em DCNT, uma vez que a alimentação pode modular a expressão de miRNAs e seus alvos de mRNA em vários processos (apoptose, regulação do ciclo celular, angiogênese e inflamação) (SHAH, DAVIDSON e CHAPKIN, 2012). São diversos os componentes nutricionais que modulam a expressão de miRNA (CUI *et al.*, 2017; GAVRILAS *et al.*, 2016; ROSS e DAVIS, 2014), sendo que, entre os componentes nutricionais cardioprotetores que podem afetar a expressão de miRNAs, destacam-se os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) ômega-3 e ômega-6 (ZHENG *et al.*, 2015).

Dietas com alto teor de ômega-3 regularam negativamente o miR-21, o qual está relacionado à inflamação, reduzindo assim a sinalização pró-inflamatória (PALMER *et al.*, 2014). Em adição, Ortega *et al.* (2015) observaram alterações no perfil de expressão de 11 miRNAs após consumo de 30 g de nozes (alimento rico em PUFA) por dia em indivíduos saudáveis. Observou-se regulação negativa dos miRNAs -328, -330, -221 e -125a, e regulação positiva dos miRNAs -192, -486, -19b, -106a, -130b, -18a e -769 após o consumo das nozes.

Dietas hiperlipídicas vêm sendo largamente estudadas na alteração de expressão de miRNAs. Isto foi observado em modelos animais obesos, porém as características destas alterações foram dependentes do tipo de lipídio consumido (PALMER *et al.*, 2014). Sabe-se que o consumo de ácidos graxos poli-insaturados vem sendo associado à redução do risco de DCNT, uma vez que diminui a expressão de miRNAs relacionados à resposta inflamatória (PALMER *et al.*, 2014; QUINTANILHA *et al.*, 2017), diferentemente dos ácidos graxos saturados, como o ácido láurico e o ácido palmítico, os quais estimulam a resposta inflamatória em adipócitos, macrófagos, células beta e outros tecidos metabólicos, culminando na expressão de genes pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 beta (IL-1 β), sendo esse processo modulado por miRNAs (QUINTANILHA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017; WONG *et al.*, 2009).

O consumo de dietas com alto teor de fibras alimentares vem se mostrando benéfico neste contexto, devido ao aumento da produção do ácido graxo de cadeia curta (AGCC) designado butirato, reduzindo o risco de doenças intestinais via miR-17 (PALMER *et al.*, 2014). As fibras alimentares são metabolizadas a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) pela microbiota intestinal durante a fermentação, a qual por sua vez, estimula o crescimento de bactérias benéficas (STEPHEN e CUMMINGS, 1980). Tipos diferentes de fibras influenciam a produção de AGCC, sendo que o amido resistente, preferencialmente, produz o butirato

(HENNINGSSON *et al.*, 2002). Juntamente com o acetato e o propionato, o butirato é um dos principais metabólitos produzidos durante o processo de fermentação de fibras alimentares pela microbiota intestinal humana no intestino grosso (CAMPOS-PEREZ e MARTINEZ-LOPEZ, 2021; FLINT *et al.*, 2012; PASCALE *et al.*, 2018). O butirato, em particular, é a fonte de energia primária para os colonócitos (~ 70%) por sofrer β -oxidação na mitocôndria e atuar na homeostase metabólica, incluindo a manutenção da integridade epitelial do cólon (HAMER *et al.*, 2008).

Além disso, outros compostos como o resveratrol, quercetina e catequinas, por meio da modulação de miRNAs, apresentam efeitos benéficos à saúde (QUINTANILHA *et al.*, 2017). Em relação aos minerais, a deficiência de selênio tem sido associada ao risco elevado de desenvolvimento de DCNT, como câncer, diabetes tipo 2 e DCV (BLEYS, NAVAS-ACIEN e GUALLAR, 2008; FLORES-MATEO *et al.*, 2006). Sob condições de deficiência, o selênio pode influenciar na regulação de diversos miRNAs. O metabolismo do ácido araquidônico, da glutatona, o estresse oxidativo e a função mitocondrial tem sido vistas como vias sensíveis ao selênio (MACIEL-DOMINGUEZ *et al.*, 2013). Intervenções em homens idosos com suplementação diária de 200 μ g selênio e 200 mg coenzima Q10 em cápsulas, por quatro anos, levaram a diferenças substanciais em 101 miRNAs. A maioria desses miRNAs desempenha papéis nos processos de DCV, estresse oxidativo e atividade inflamatória, resultando em mortalidade cardiovascular reduzida e diminuição da inflamação e do estresse oxidativo (ALEHAGEN *et al.*, 2017).

De maneira semelhante, Reis *et al.* (2019) avaliaram o efeito de uma intervenção de 2 meses com castanha-do-Brasil em mulheres com obesidade ou com síndrome metabólica (SM), e observaram aumento da expressão dos miR-454-3p e miR-584-5p, após o consumo de 1 unidade de castanha-do-Brasil por dia, durante 2 meses. Dessa forma, a ingestão diária de castanha do Brasil elevou a expressão de dois miRNAs relacionados às vias de ativação dos receptores de vitamina D e de ácido retinóico, indicando uma ligação entre a ingestão de selênio, o metabolismo da vitamina D e a homeostase do cálcio (REIS *et al.*, 2019).

De maneira semelhante, a deficiência de zinco causa aumento da expressão de genes inflamatórios e expressão alterada de miRNAs em vários tecidos e células de ratos (pele, pulmão, pâncreas, fígado, próstata e células mononucleares do sangue periférico), causando principalmente desregulação de miRNAs associados à inflamação, quando comparados a animais controles (ALDER *et al.*, 2012). Em humanos, um total de 20 miRNAs demonstrou responder a um regime alimentar de depleção de zinco, tendo esse efeito revertido pela reposição subsequente de zinco (RYU *et al.*, 2011).

O estilo de vida também vem sendo associado à expressão de miRNAs. Resultados de uma revisão sistemática relataram uma associação entre miRNAs circulantes e exercício físico. No entanto, apenas dois estudos relataram alterações nos miRNAs associados à dieta e perda de peso, com regulação negativa de miR-16, e regulação positiva de miR-130b e miR-221. No entanto, há poucos estudos investigando essa associação, o que torna esta evidência fraca, segundo os autores (FLOWERS, WON e FUKUOKA, 2015).

Portanto, os miRNAs vêm surgindo como alternativa para auxiliar na redução do risco e manejo de DCNT. Estudos em nutrição podem contribuir para identificação de novos biomarcadores e mecanismos de ação de componentes dietéticos a fim de entender como esses nutrientes controlam esses miRNAs e regulam mecanismos fisiológicos (QUINTANILHA *et al.*, 2017). Além disso, ressalta-se a necessidade de mais estudos abordando fatores de estilo de vida e como estes estão associados à expressão de miRNAs.

Perante o exposto, não há na literatura estudos de base populacional que relacionam a expressão de miRNAs com biomarcadores do controle metabólico (glicêmicos, lipídicos e inflamatórios), dieta e estado nutricional na população idosa brasileira. Assim, faz-se necessários estudos desta natureza a fim de se obter resultados que poderão ser utilizados como objeto de estudo em pesquisas acadêmicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil de expressão de miRNAs no plasma e investigar sua associação com biomarcadores de risco cardiometabólico, estado nutricional e dieta em idosos participantes do estudo de base populacional ISA Capital.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a expressão plasmática de 21 miRNAs relacionados ao metabolismo glicêmico e lipídico, à obesidade e à resposta inflamatória em idosos;
- Verificar relações entre os miRNAs plasmáticos e o perfil lipídico dos indivíduos avaliados em idosos;
- Verificar relações entre os miRNAs plasmáticos e biomarcadores do controle glicêmico dos indivíduos avaliados em idosos;
- Verificar relações entre os miRNAs plasmáticos e biomarcadores inflamatórios dos indivíduos avaliados em idosos;
- Analisar a expressão dos 21 miRNAs plasmáticos de acordo com a presença de síndrome metabólica;
- Analisar a expressão dos 21 miRNAs plasmáticos de acordo com o SIS;
- Verificar interações entre os 21 miRNAs plasmáticos e os componentes alimentares relacionados à redução ou aumento do risco de desenvolvimento de DCNT em idosos.

3 MÉTODOS

O presente trabalho é um recorte do projeto de pesquisa intitulado “Estilo de vida, marcadores bioquímicos e genéticos como fatores de risco cardiometabólico: Inquérito de Saúde na cidade de São Paulo”, denominado ISA Nutrição 2015, o qual foi aprovado na modalidade Auxílio à Pesquisa – Projeto Temático, junto à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo - FAPESP (Processo 2017/05125-7).

O ISA Nutrição 2015 utiliza uma subamostra proveniente da Pesquisa de Saúde de São Paulo (ISA Capital 2015), criada a fim de reunir informações acerca das condições de vida, estado de saúde, estilo de vida e uso de serviços de saúde da população da cidade de São Paulo (FISBERG *et al.*, 2018). O ISA Capital trata-se de um estudo transversal de base populacional realizado de forma periódica, que foi criado a partir do convênio firmado entre a Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo e o Centro de Apoio à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (CESAR *et al.*, 2005).

3.1 AMOSTRAGEM ISA NUTRIÇÃO 2015

Para o estudo realizou-se amostragem probabilística estratificada por sorteio em dois estágios: setores censitários e domicílios. Na primeira etapa foram selecionados aleatoriamente 30 setores censitários urbanos de cada área geográfica para atendimento à saúde (Norte, Centro-Oeste, Sudeste, Sul e Leste), totalizando 150 unidades primárias de amostragem no município. Em sequência, foram selecionados sistematicamente 18 domicílios particulares em cada setor censitário, considerando cada domínio demográfico utilizado para o planejamento da amostra (área geográfica de atendimento à saúde, distrito/setor, faixa etária e sexo). Desse modo, foi estimada amostra total de 4.250 pessoas, com o número máximo de 850 pessoas em cada área geográfica para atendimento à saúde. Dos indivíduos selecionados, o total de 4059 aceitaram participar (FISBERG *et al.*, 2018).

O ISA Nutrição 2015 foi composto por uma subamostra do ISA-Capital 2015 e tinha como objetivo incluir 900 indivíduos, distribuídos igualmente em três faixas etárias: adolescentes (idade de 12 a 19 anos), adultos (idade de 20 a 59 anos) e idosos (idade \geq 60 anos). O plano de amostragem estimou proporções de 0,50, com erro amostral de sete pontos percentuais, considerando intervalo de 95% de confiança e efeito de delineamento de 1,5. Com isso, daqueles que concordaram em participar do ISA Capital 2015 ($n = 4.059$), 1.737 indivíduos foram selecionados aleatoriamente para o ISA Nutrição 2015 e responderam ao

primeiro recordatório alimentar de 24 horas. Esses participantes foram convidados para a segunda fase da pesquisa, na qual, o total de 901 indivíduos concordaram em fazer a coleta de sangue, realizar as avaliações antropométricas e de pressão arterial e responder ao segundo recordatório alimentar de 24 horas (FISBERG *et al.*, 2018).

3.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O presente estudo com delineamento transversal, de base populacional, avaliou um subamostra de 200 indivíduos idosos (≥ 60 anos de idade), participante do ISA Nutrição 2015. As coletas de dados foram realizadas no período de fevereiro de 2015 a fevereiro de 2016, no município de São Paulo (FISBERG *et al.*, 2018).

A subamostra foi selecionada mediante os seguintes critérios de exclusão: presença de doenças inflamatórias agudas e câncer, tabagismo e o uso de medicamentos que pudessem interferir nos marcadores de interesse (antibióticos, anti-inflamatórios, imunomoduladores, antirretrovirais). No estudo ISA Capital 2015 não participaram indivíduos que faziam uso de dieta enteral e/ou parenteral, bem como mulheres em período de gestação ou lactação. Além disso, foram selecionados apenas os indivíduos com dados completos para as variáveis antropométricas, pressão arterial sistêmica e biomarcadores glicêmicos, lipídicos e inflamatórios.

3.3 COLETA DE DADOS

3.3.1 Dados antropométricos e pressão arterial

Foram coletados dados de peso, estatura e circunferência da cintura, segundo os procedimentos de aferição recomendados pela Organização Mundial de Saúde e adotados pelo Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Os valores médios de peso e de altura de cada indivíduo do estudo foram utilizados para o cálculo do índice de massa corporal (IMC), definido como a massa corporal em quilos dividido pelo quadrado da estatura em metros (kg/m^2). Os valores de IMC foram utilizados para a classificação do estado nutricional antropométrico do indivíduo, de acordo com os critérios padronizados pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS, 2002).

A circunferência da cintura foi utilizada para o diagnóstico da obesidade central, segundo critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde: ≥ 102 cm para homens e ≥ 88 cm para mulheres (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

A pressão arterial foi aferida em duplicata utilizando-se técnica oscilométrica por meio de aparelho automático (Omron model HEM-712C, Omron Health Care, Inc, EUA). As medidas foram realizadas com adequação do manguito à circunferência braquial. Em caso de diferença superior a 10% entre as medidas, uma terceira medida foi feita.

Além disso, os indivíduos foram avaliados quanto à presença de SM de acordo com critérios definidos pela *International Diabetes Federation* (2006) (Tabela 1).

Tabela 1 – Critérios para classificação de Síndrome Metabólica nos indivíduos avaliados.

<u>Para ser classificado com síndrome metabólica, o indivíduo deve apresentar, obrigatoriamente, obesidade central + dois dos fatores de risco abaixo</u>	
Triacilglicerol elevado	≥ 150 mg/dL (1,7 mmol/L) <i>ou tratamento específico para esta alteração lipídica</i>
HDL-colesterol reduzido	< 40 mg/dL (1,03 mmol/L) em homens < 50 mg/dL (1,29 mmol/L) em mulheres <i>ou tratamento específico para esta alteração lipídica</i>
Pressão arterial elevada	PAS ≥ 130 mmHg ou PAD ≥ 85 mmHg <i>ou tratamento de hipertensão previamente diagnosticada</i>
Glicemia em jejum elevada	≥ 100 mg/dL (5,6 mmol/L), <i>ou diabetes tipo 2 previamente diagnosticada</i>
<u>Valores específicos da circunferência da cintura de acordo com o sexo e seguindo classificação específica de acordo com etnia, conforme preconizado pela IDF</u>	
Circunferência da cintura*	> 90 cm em homens ≥ 80 cm em mulheres

PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; IDF, *International Diabetes Federation*.

* De acordo com a *International Diabetes Federation*, para os valores de referência da circunferência da cintura de populações da América do Sul, deve-se adotar a mesma classificação das populações da Ásia.

3.3.2 Material biológico

Foram colhidos cerca de 30 mL de sangue dos participantes em jejum (12 a 14 horas), por meio de punção venosa com o auxílio de seringas estéreis e descartáveis, por profissionais especializados no domicílio dos participantes, de acordo com agendamento prévio. Os participantes foram orientados a não consumirem bebidas alcoólicas nas 72 horas que

antecederam a coleta de sangue, bem como, a evitarem exercícios físicos intensos no dia anterior e no dia agendado para coleta de sangue.

O sangue foi colhido em tubos secos e em tubos contendo os anticoagulantes ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e fluoreto de sódio, armazenados em isopor com gelo reciclável e transportados para o Laboratório de Genômica Nutricional e Inflamação da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Alíquotas de soro e de plasma foram separadas por meio de centrifugação e armazenadas em freezer -80 °C, para a posterior determinação dos marcadores glicêmicos, lipídicos, inflamatórios e avaliação da expressão dos miRNAs de interesse.

3.3.3 Dados dietéticos

Para avaliar o consumo alimentar utilizou-se o método de recordatório alimentar de 24 horas (R24h), que foram aplicados presencialmente e por ligação telefônica, baseando-se no Multiple Pass Method e no Automated Multiple Pass Method (AMPM), respectivamente (GUENTHER *et al.*, 1996). Os R24h foram aplicados ao longo de todo o ano, com a finalidade de minimizar o viés de mudanças alimentares nos finais de semana e diferentes estações do ano.

Os R24h foram analisados utilizando o software *Nutrition Data System for Research* (NCC, Minnessota, USA), o qual utiliza os valores dos nutrientes presentes na *USDA National Nutrient Database Standard Reference*. Visto o programa apresentar uma base de dados americana, realizou-se validação do valor nutricional dos alimentos utilizando tabelas de composição de alimentos nacionais (TACO e TBCA), sendo utilizados apenas alimentos que obtiveram concordância entre 80% e 120% dos valores de energia e macronutrientes. Além disso, foram traduzidos mais de 700 itens alimentares, preparações e métodos de preparo, bem como, incluídas de maneira padronizada preparações tipicamente brasileiras utilizadas pela população de estudo. O banco de dados gerado foi avaliado quanto a consistência dos dados digitados, sendo considerados inconsistentes valores de energia menores que 800 ou maiores que 4000 kcal/dia (FISBERG *et al.*, 2002; FISBERG; MARCHIONI, 2012).

3.4 DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES GLICÊMICOS E LIPÍDICOS

A concentração de glicemia em jejum foi determinada no plasma oriundo de tubos de fluoreto, por meio do método enzimático colorimétrico da glicose oxidase e utilizando kits de reagentes da Cobas® (Roche Diagnostics GmbH®, Mannheim, Alemanha). A partir do plasma

extraído do tubo contendo EDTA realizou-se a dosagem de insulina, por meio de imunoenensaio multiplex, utilizando-se kit LINCOpnex® (Linco Research Inc., St. Charles, MO, EUA). Calculou-se o HOMA-IR a partir da fórmula:

$$HOMA-IR = \text{insulina plasmática em jejum } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glicose plasmática em jejum } (\text{mmol/L}) / 22,5$$

O ponto de corte adotado para o HOMA-1R foi de 2,71, como proposto no estudo de Geloneze *et al.* (2009), validado para a população brasileira.

A determinação do perfil lipídico foi realizada por meio de método enzimático e colorimétrico, utilizando-se reagentes da Cobas® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). A concentração de VLDL-c foi calculada por meio da divisão da concentração plasmática de triacilgliceróis por cinco.

3.5 DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS

As concentrações plasmáticas dos biomarcadores inflamatórios IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , proteína quimiotática para monócitos 1 (CCL2/MCP-1) e inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1); dos hormônios adiponectina e leptina e das moléculas de adesão solúveis intercelular 1 (ICAM-1) e vascular 1 (VCAM-1) foram determinadas com o auxílio de kits MILLIPLEX® map (Cat. nº HCYTOMAG-60K-05, HADK1MAG-61K-02, HCVD2MAG-67K-02, EZHL-80SK; Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha). A detecção das citocinas ocorre por meio de fluorescência, que é emitida após a ligação das mesmas aos seus anticorpos específicos unidos a fluoróforos, seguida da reação com o anticorpo secundário marcado com ficoeritina. A fluorescência emitida é diretamente proporcional à quantidade de analito capturado, que são identificados por gradação de cores e quantificados baseando-se em uma curva padrão.

A quantificação da proteína C reativa ultrasensível plasmática foi realizada por meio da técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), utilizando o kit de análise (Cat. nº HEA821Hu; Cloud-Clone Corp., Houston, TX, EUA).

3.6 EXPRESSÃO DE miRNAs

A escolha dos miRNAs a serem analisados baseou-se no resultado de buscas na literatura, sendo selecionados 21 miRNAs previamente identificados em plasma humano, que

demonstraram associação com biomarcadores glicêmicos, lipídicos, inflamatórios e excesso de peso/obesidade (Tabela 2).

Tabela 2 – MiRNAs avaliados no plasma de humanos relacionados ao excesso de peso, à obesidade, à resposta inflamatória e ao metabolismo da glicose e de lipídios.

Associação	miRNA		Referências
	<i>Downregulated</i>	<i>Upregulated</i>	
Excesso de peso/obesidade	miR-130b miR-146a miR-223	miR-16 miR-140-5p miR-222 miR-376a	MA; FU; GARVEY, 2018; ORTEGA <i>et al.</i> , 2014; PRATS-PUIG <i>et al.</i> , 2013; ZHAO <i>et al.</i> , 2017
Inflamação	miR-28-3p miR-126	miR-363 miR-486-5p	CANDIA <i>et al.</i> , 2017; DONGHUI <i>et al.</i> , 2019; ORTEGA <i>et al.</i> , 2014; PRATSPUIG <i>et al.</i> , 2013; WANG <i>et al.</i> , 2014; ZAMPETAKI <i>et al.</i> , 2010
Metabolismo glicêmico	miR-15a miR-21 miR-30d miR-375	miR-30a-5p miR-122 miR-150	JIMÉNEZ-LUCENA <i>et al.</i> , 2018; WANG <i>et al.</i> , 2014; ZAMPETAKI <i>et al.</i> , 2010
Metabolismo lipídico	miR-139-3p miR-532-5p miR-let-7c	-	GIARDINA <i>et al.</i> , 2019; ORTEGA <i>et al.</i> , 2014; PRATS-PUIG <i>et al.</i> , 2013; ZHAO <i>et al.</i> , 2017

A expressão dos 21 miRNAs (miR-15a-5p, miR-16-5p, miR-21-5p, miR-28-3p, miR-30a-5p, miR-30d-5p, miR-122-5p, miR-126-3p, miR-130b-3p, miR-139-3p, miR-140-5p, miR-146a-5p, miR-150-5p, miR-222-3p, miR-223-3p, miR-363-3p, miR-375-3p, miR-376a-3p, miR-486-5p, miR-532-5p, miR-let-7c-5p) foi analisada nas alíquotas de plasma, utilizando *real-time qPCR* com BioMark™ 96.96 Fluidigm Dynamic Array (PJ1910334). Todas as amostras foram controladas para hemólise por medição de hemoglobina livre a 414 nm usando placa NanoQuant em espectrofotômetro TECAN (Männedorf, Suíça), no qual amostras com valor DO acima de 0,22 foram identificadas com hemólise e descartadas. O cálculo foi baseado nos resultados do estudo de Kirschner *et al.* (2013) realizado com miRNAs característicos de hemólise: miR-16 e miR-451.

O RNA total foi extraído do plasma (300 µL) utilizando kit de purificação de RNA exossômico e de circulação de plasma/soro (cat.42800) Norgen® (Thorold, ON, Canadá), de acordo com o protocolo padrão do fabricante. As amostras foram enriquecidas com cel-miR39-3p 2,7-4 µM (IDT) e o RNA foi eluído em tampão de eluição em 80 µl. Para a transcrição reversa foi utilizado 15 µL da solução eluída de RNA e o kit miRCURY LNA RT (Cat.339340), Qiagen-França, de acordo com as instruções do fornecedor. Para as reações, foi utilizado

UniSP6 como controle “spike-in” (parte do kit Spike-in Cat.339390) fornecido pela Qiagen-France (Coutaboeuf).

A pré-amplificação foi realizada usando iniciadores de ensaio miRCURY LNA microRNA PCR (Cat.339306) Qiagen-França (Coutaboeuf), para os 21 miRNAs de interesse mais RT Spike-in UniSp6 e Extraction Spike-in cel-miR-39. O produto da transcrição reversa foi purificado com Exonuclease I (Cat. M0293) New England Biolabs France (Evry) e diluído na concentração 1:10. Logo depois, 1,25 µL de cDNA diluído foi pré-amplificado usando Fluidigm (Les Ulis-France) PreAmp Master mix (Cat 100-5580) e mistura de *primers* em 5 µL de volume de reação de acordo com as especificações do fornecedor.

O produto oriundo da pré-amplificação foi diluído na concentração 1:10 usando Biotium (Fremont, CA) - Fast Probe Master Mix (Cat.310005) e adicionado (1,5 µL) em triplicata em matrizes dinâmicas 96x96 IFC (Cat. BMK-M-96.96) Biomark TM ambos da Fluidigm (Les Ulis-France) para cada ensaio qPCR de acordo com o protocolo do fornecedor. A amplificação qRT-PCR seguiu o protocolo padrão recomendado pela Exiqon Fluidigm-BioMark e consiste no aquecimento por 2 minutos e desnaturação a 95 °C por 10 segundos, 40 ciclos a 95 °C por 10 segundos, seguido de anelamento/extensão (56 °C, 1 minuto).

Valores brutos de Ct superiores a 40 foram considerados indetectáveis. O método DCt foi utilizado para calcular valores relativos de expressão. A primeira etapa de normalização ajustou os valores brutos de Ct aos níveis recuperados de spike-in cel-miR-39 e Spike-in UniSp6. A segunda etapa de normalização subtraiu o Ct normalizado para amostras individuais da média de todos os ensaios individuais para cada miRNA. Os valores de *fold change* calculados a partir dos dados DCt normalizados foram utilizados nos testes estatísticos.

3.7 CÁLCULO DO ESCORE DE INFLAMAÇÃO SISTÊMICA DE BAIXO GRAU (SIS)

O Escore de Inflamação Sistêmica de baixo grau (SIS) foi calculado a partir da concentração plasmática de 10 biomarcadores inflamatórios (proteína C reativa, IL-6, IL-1β, TNF-α, MCP-1, PAI-1, sICAM-1, sVCAM-1, adiponectina e IL-10), e com base na metodologia proposta por Tabung *et al.* (2016). Esse escore foi calculado a partir da soma dos valores desses biomarcadores inflamatórios, os quais foram transformados para logaritmo na base neperiana e padronizados em escore-z. Esse escore atribuiu carga negativa para biomarcadores com ação anti-inflamatória (adiponectina e IL-10) (NORDE *et al.*, 2020; TABUNG *et al.*, 2016). Dessa forma, o SIS foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\begin{aligned}
 SIS = & \text{escore } Z(\text{logn } CRP) + \text{escore } Z(\text{logn } IL-6) + \text{escore } Z(\text{logn } IL-1\beta) + \text{escore } Z(\text{logn } \\
 & TNF-\alpha) + \text{escore } Z(\text{logn } PAI-1) + \text{escore } Z(\text{logn } MCP-1) + \text{escore } Z(\text{logn } sICAM-1) + \\
 & \text{escore } Z(\text{logn } sVCAM-1) - \text{escore } Z(\text{logn } adiponectin) - \text{escore } Z(\text{logn } IL-10)
 \end{aligned}$$

3.8 AVALIAÇÃO DOS GRUPOS ALIMENTARES

Os grupos alimentares avaliados neste trabalho foram selecionados de acordo com a existência de evidências que mostrem associações negativas (grupos de proteção) ou positivas (grupos de risco) relacionados a desfechos de saúde associados ao risco cardiometabólico (MELLO; SARTI; FISBERG, 2022). O agrupamento dos itens alimentares em categorias de risco e proteção foi feito de acordo com o sistema de classificação de alimentos “*What We Eat In America*” (WWEIA), baseado na base de dados Pesquisa Nacional de Avaliação da Saúde e Nutrição (NHANES) (RHODES *et al.*, 2020), adaptado para o contexto latino-americano (FISBERG *et al.*, 2021).

Os grupos alimentares de frutas, hortaliças, leguminosas, oleaginosas e sementes, grãos integrais, peixes e frutos do mar, leites e iogurte foram considerados como de proteção, enquanto que carnes vermelhas, carnes processadas e bebidas açucaradas foram considerados grupos alimentares de risco para doenças cardiometabólicas (FISBERG *et al.*, 2021; MELLO; SARTI; FISBERG, 2022). A descrição de cada grupo alimentar avaliado nesse estudo está disposta na Tabela 3

Tabela 3 - Componentes dos grupos alimentares de risco e de proteção para doenças cardiometabólicas.

Grupos alimentares de proteção	
<i>Frutas</i>	Todos os tipos de frutas; sucos foram excluídos
<i>Hortaliças</i>	Hortaliças e folhas verdes; batatas foram excluídas
<i>Feijões e leguminosas</i>	Feijões e ervilhas
<i>Oleaginosas e sementes</i>	Amêndoas, castanha-do-Brasil, amendoins, nozes, sementes de abóbora, sementes de gergelim
<i>Cereais</i>	Biscoitos, pães, massas integrais, arroz integral, cereais matinais, aveia
<i>Peixes e frutos do mar</i>	Todos os tipos de peixe e frutos do mar
<i>Leites e iogurte</i>	Todos os tipos de leite e iogurte

Tabela 3 (continuação) - Componentes dos grupos alimentares de risco e de proteção para doenças cardiometabólicas.

Grupos alimentares de risco	
<i>Carnes vermelhas</i>	Carnes de porco, vaca e cordeiro
<i>Carnes processadas</i>	Hambúrguer, almôndegas, salsicha, bacon, presunto, salsichas, frios e carnes curadas
<i>Bebidas açucaradas</i>	Todos os tipos de bebidas prontas para beber com adição de açúcar (refrigerantes, bebidas de frutas, bebidas esportivas e energéticas, bebidas nutricionais, <i>smoothies</i>).

Adaptado de MELLO; SARTI; FISBERG, 2022.

3.9 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

O *software* de bioinformática TargetScan (<http://www.targetscan.org>) foi utilizado para identificar potenciais alvos para os miRNAs avaliados.

3.10 ASPECTOS ÉTICOS

Os participantes foram esclarecidos acerca dos aspectos metodológicos do estudo, procedimentos aos quais foram submetidos, destino do material biológico coletado e do direito de desligar-se da pesquisa em qualquer momento, sem constrangimentos. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, elaborado de acordo com as Resoluções CNS nº 441/2011 e nº 466/2012 (BRASIL, 2011; 2012) que tratam da proteção dos participantes e orienta procedimentos referentes às pesquisas que necessitam de experiências com humanos.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (# 49221121.4.0000.5421 e # 30848914.7.0000.5421 para o ISA Nutrição 2015) e pela Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo (# 36607614.5.0000.5421) (ANEXO A).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Estatísticas descritivas, incluindo proporções, médias e erros padrão, foram calculadas e analisadas para obter uma visão abrangente dos dados.

O teste ajustado de Wald foi utilizado para comparar a expressão plasmática de miRNAs de indivíduos agrupados pela presença ou não de SM. O coeficiente tau-a de Kendall foi usado para estimar a correlação entre a expressão plasmática de miRNAs e variáveis lipídicas, glicêmicas e antropométricas, incluindo intervalos de confiança, usando um desenho de pesquisa complexo para garantir a representatividade em nível populacional.

Além disso, o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney foi empregado para avaliar diferenças significativas na SIS entre grupos divididos de acordo com o sexo e a presença de SM. O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para estimar a correlação entre a expressão plasmática de miRNAs e variáveis lipídicas, glicêmicas e antropométricas. Os intervalos de confiança também foram calculados utilizando o desenho complexo do inquérito para garantir a representatividade ao nível da população.

Ademais, adotou-se modelos lineares generalizados (MLGs) para analisar relações complexas entre variáveis, como o efeito de múltiplas covariáveis, levando em consideração a distribuição não normal de algumas variáveis, fornecendo uma compreensão mais abrangente dos fatores que podem influenciar as associações observadas entre a expressão plasmática de miRNAs. Os MLGs foram utilizados tanto para analisar as associações entre a expressão plasmática dos miRNAs, leptina e SIS, como também para analisar as associações entre a expressão plasmática dos miRNAs e o consumo dos diferentes grupos alimentares avaliados.

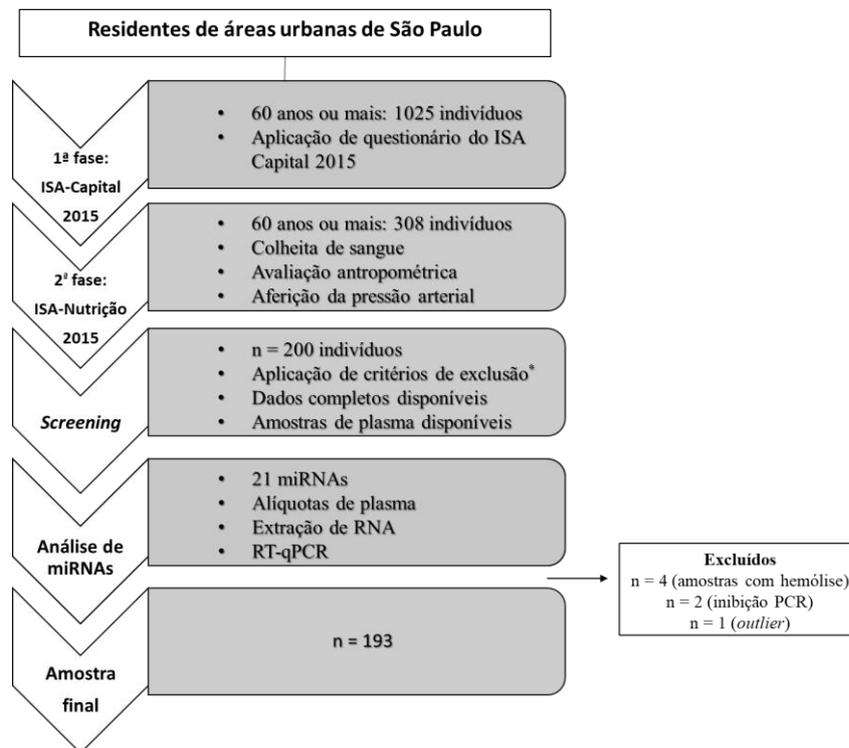
Por fim, um modelo de regressão logística foi testado a fim de examinar como o consumo dos diferentes grupos alimentares podem influenciar na presença de SM.

As análises foram realizadas nos *softwares* Stata/SE (versão 17.0) e R (versão 4.2.3), com nível de significância de 0,05.

4 RESULTADOS

A amostra final deste trabalho consistiu em 193 participantes, uma vez que quatro indivíduos apresentaram amostra de sangue com hemólise, dois indivíduos tiveram inibição no ensaio de PCR e um participante foi considerado *outlier*. As etapas de seleção da subamostra do presente estudo estão dispostas na Figura 2.

Figura 2 – Etapas da seleção da subamostra do presente estudo.



Adaptado de: FISBERG et al., 2018; CARVALHO et al., 2023.

Legenda: *Critérios de exclusão: presença de doenças inflamatórias agudas, câncer e uso de medicamentos (antibióticos, anti-inflamatórios, imunomoduladores, antirretrovirais) que pudessem interferir nos marcadores de interesse, alcoolismo crônico, uso de dieta enteral/parenteral, e gravidez/lactação.

As principais características dos indivíduos avaliados neste estudo estão listadas na Tabela 4. Da amostra avaliada, 50,4% eram mulheres, com idade média de 69,1 (0,5) anos. Além disso, 45,2% da amostra apresentavam-se com sobrepeso/obesidade, além de mostrarem valores médios de CC elevados. Além disso, 64,7% dos participantes tinham SM e 50,9% tinham resistência à ação da insulina (Tabela 4).

Tabela 4 - Caracterização dos indivíduos participantes do estudo de base populacional ISA-Nutrição (n = 193).

Variáveis	Total (n=193)
Sexo, n (%)	
Masculino	92 (49,4)
Feminino	101 (50,6)
Idade (anos)	69,1 (0,5)
IMC (kg/m ²)	27,5 (0,4)
Sobrepeso/Obesidade, n (%)	87 (45,1)
Circunferência da cintura (cm)	99,8 (1,3)
PAS (mmHg)	138,2 (1,4)
PAD (mmHg)	76,2 (0,7)
Presença de SM, n (%)	126 (64,7)
Atividade física (minutos por semana)	658,8 (68,8)
Colesterol total (mg/dL)	184,0 (3,7)
HDL-c (mg/dL)	47,2 (1,4)
LDL-c (mg/dL)	110,4 (3,4)
VLDL-c (mg/dL)	26,3 (1,0)
Colesterol não-HDL (mg/dL)	136,7 (3,4)
Triacilgliceróis (mg/dL)	131,3 (4,9)
Glicemia em jejum (mg/dL)	111,5 (2,5)
Insulina em jejum (μUI/mL)	13,0 (0,8)
HOMA-IR	3,8 (0,3)
Resistência à insulina, n (%)	103 (50,9)

Dados apresentados em frequências absolutas e relativas (n, %) e média (erro padrão).

IMC, índice de massa corporal; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; SM, síndrome metabólica; HDL-c, colesterol associado à lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol associado à lipoproteína de muito baixa densidade; HOMA-IR, modelo homeostático de avaliação de resistência à insulina.

Os dados de expressão plasmática dos miRNAs estão dispostos abaixo (Tabela 5).

Tabela 5 – Expressão plasmática dos 21 miRNAs estudados nos indivíduos avaliados.

miRNA	Expressão plasmática (fold change)
miR-15a	1,1 ± 0,1
miR-16	1,4 ± 0,1
miR-21	1,2 ± 0,1
miR-28	1,6 ± 0,2

Tabela 5 (continuação) – Expressão plasmática dos 21 miRNAs estudados nos indivíduos avaliados.

miRNA	Expressão plasmática (fold change)
miR-30a	1,1 ± 0,1
miR-30d	1,2 ± 0,1
miR-122	1,8 ± 0,3
miR-126	1,2 ± 0,1
miR-130b	1,4 ± 0,1
miR-139	1,2 ± 0,1
miR-140	1,3 ± 0,1
miR-146a	1,4 ± 0,1
miR-150	1,1 ± 0,1
miR-222	1,3 ± 0,1
miR-223	1,7 ± 0,2
miR-363	1,2 ± 0,1
miR-375	1,2 ± 0,1
miR-376a	1,6 ± 0,1
miR-486	1,2 ± 0,1
miR-532	1,4 ± 0,1
miR-let7c	1,2 ± 0,1

Quando avaliados de acordo com a SM, observou-se que os indivíduos com SM apresentaram maiores valores de peso corporal, IMC, CC, PAS, PAD, glicemia, insulina, HOMA-IR, VLDL-c, colesterol não HDL e triacilgliceróis e menores concentrações plasmáticas de HDL-c (Tabela 6). Além disso, a expressão plasmática do miR-122 e do miR-30a foi maior em indivíduos com SM em relação àqueles sem SM (Figura 3).

Tabela 6 - Caracterização da subamostra dos idosos participantes do estudo de base populacional ISA-Nutrição, de acordo com a presença de síndrome metabólica (n = 193).

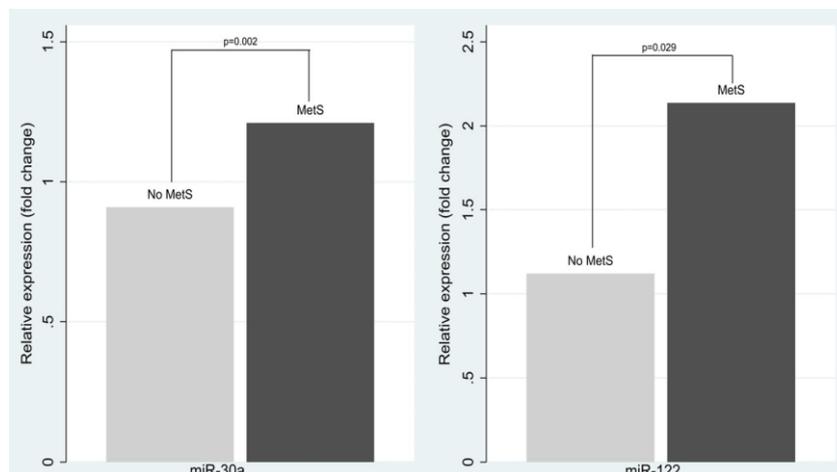
Variáveis	Sem SM (n=67)	Com SM (n=126)	p-valor
Sexo, n (%)			
Masculino	30 (45,1)	62 (51,7)	0,374
Feminino	45 (54,9)	56 (48,3)	
Idade (anos)	69,6 (1,0)	68,8 (0,7)	0,514
Peso corporal (kg)	68,8 (1,4)	74,0 (1,4)	0,011*
Estatura (m)	1,6 (0,1)	1,6 (0,1)	0,899

Tabela 6 (continuação) - Caracterização da subamostra dos idosos participantes do estudo de base populacional ISA-Nutrição, de acordo com a presença de síndrome metabólica (n = 193).

Variáveis	Sem SM (n=67)	Com SM (n=126)	p-valor
IMC (kg/m ²)	26,2 (0,5)	28,2 (0,4)	0,002*
Classificação do IMC, n (%)			
Baixo peso	19 (25,0)	15 (10,9)	0,016*
Peso adequado	28 (41,8)	47 (37,4)	
Sobrepeso/Obesidade	22 (33,2)	65 (51,7)	
Circunferência da cintura (cm)	95,5 (1,5)	102,0 (1,6)	0,002*
PAS (mmHg)	130,3 (2,0)	142,4 (2,0)	< 0,001*
PAD (mmHg)	72,9 (1,1)	78,0 (1,0)	0,002*
Atividade física (minutos por semana)	595,3 (66,4)	778,7 (148,7)	0,256
Colesterol total (mg/dL)	183,0 (5,4)	184,5 (4,0)	0,775
HDL-c (mg/dL)	54,8 (1,4)	43,1 (1,6)	< 0,001*
LDL-c (mg/dL)	109,6 (4,7)	110,9 (3,7)	0,785
VLDL-c (mg/dL)	18,6 (0,7)	30,5 (1,2)	< 0,001*
Colesterol não-HDL (mg/dL)	128,2 (5,0)	141,4 (3,7)	0,014*
Triacilgliceróis (mg/dL)	92,6 (3,5)	152,4 (6,1)	< 0,001*
Glicemia em jejum (mg/dL)	95,6 (2,7)	120,3 (3,6)	< 0,001*
Insulina em jejum (μUI/mL)	9,5 (0,7)	15,0 (1,0)	< 0,001*
HOMA-IR	2,2 (0,2)	4,6 (0,4)	< 0,001*

Dados apresentados em frequências absolutas e relativas (n, %) e média (erro padrão). *Diferença entre grupos com e sem síndrome metabólica. Teste qui-quadrado para variáveis categóricas. Teste de Mann-Whitney para variáveis contínuas. SM, síndrome metabólica; IMC, índice de massa corporal; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; HDL-c, colesterol associado à lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol associado à lipoproteína de muito baixa densidade; HOMA-IR, modelo homeostático de avaliação de resistência à insulina.

Figura 3 - Expressão plasmática de miR-30a e miR-122 em idosos de acordo com diagnóstico SM (n=193)



Dados apresentados em média e erro padrão. Foi realizado o teste ajustado de Wald.

Realizou-se ainda teste de correlação entre os miRNAs que diferiram de acordo com a SM (miR-30a e miR-122) e variáveis antropométricas, glicêmicas, lipídicas e pressão arterial (Tabela 7). A expressão de miR-122 e miR-30a foi positivamente correlacionada com glicemia, insulinemia, HOMA-IR, LDL-c e colesterol não HDL. Além disso, a expressão plasmática do miR-30a apresentou correlação positiva com a PAD e a concentração plasmática de triacilgliceróis (Tabela 7).

Tabela 7 - Correlações entre miRNAs e variáveis antropométricas, glicêmicas, lipídicas e pressão arterial em idosos participantes do estudo de base populacional ISA Nutrição (n=193).

		miR-122	miR-30a
	<i>Coeficiente</i>	0,068	0,084
Peso corporal (kg)	<i>IC 95%</i>	-0,029 – 0,167	-0,025 – 0,194
	<i>p-valor</i>	0,167	0,128
	<i>Coeficiente</i>	0,041	0,026
IMC (kg/m²)	<i>IC 95%</i>	-0,045 – 0,127	-0,074 – 0,127
	<i>p-valor</i>	0,345	0,608
	<i>Coeficiente</i>	0,053	0,052
CC (cm)	<i>IC 95%</i>	-0,043 – 0,151	-0,050 – 0,154
	<i>p-valor</i>	0,274	0,316
	<i>Coeficiente</i>	0,044	0,099
PAS (mmHg)	<i>IC 95%</i>	-0,063 – 0,152	-0,009 – 0,208
	<i>p-valor</i>	0,421	0,073
	<i>Coeficiente</i>	0,111	0,110
PAD (mmHg)	<i>IC 95%</i>	-0,003 – 0,226	0,005 – 0,217
	<i>p-valor</i>	0,056	0,041*
	<i>Coeficiente</i>	0,141	0,120
Glicemia em jejum (mg/dL)	<i>IC 95%</i>	0,343 – 0,249	0,016 – 0,224
	<i>p-valor</i>	0,010*	0,023*
	<i>Coeficiente</i>	0,128	0,131
Insulina em jejum (µUI/mL)	<i>IC 95%</i>	0,017 – 0,240	0,018 – 0,245
	<i>p-valor</i>	0,023*	0,024*
	<i>Coeficiente</i>	0,159	0,161
HOMA-IR	<i>IC 95%</i>	0,044 – 0,274	0,046 – 0,276
	<i>p-valor</i>	0,007*	0,006*

Tabela 7 (continuação) - Correlações entre miRNAs e variáveis antropométricas, glicêmicas, lipídicas e pressão arterial em idosos participantes do estudo de base populacional ISA Nutrição (n=193).

		miR-122	miR-30a
Colesterol total (mg/dL)	<i>Coeficiente</i>	0,104	0,091
	<i>IC 95%</i>	-0,003 – 0,212	-0,018 – 0,201
	<i>p-valor</i>	0,057	0,102
HDL-c (mg/dL)	<i>Coeficiente</i>	-0,126	-0,168
	<i>IC 95%</i>	-0,226 – -0,026	-0,276 – -0,062
	<i>p-valor</i>	0,014*	0,002**
VLDL-c (mg/dL)	<i>Coeficiente</i>	0,068	0,116
	<i>IC 95%</i>	-0,037 – 0,175	0,015 – 0,217
	<i>p-valor</i>	0,204	0,024*
LDL-c (mg/dL)	<i>Coeficiente</i>	0,122	0,129
	<i>IC 95%</i>	0,011 – 0,234	0,021 – 0,237
	<i>p-valor</i>	0,031*	0,019*
Não-HDL-c (mg/dL)	<i>Coeficiente</i>	0,144	0,159
	<i>IC 95%</i>	0,035 – 0,254	0,054 – 0,264
	<i>p-valor</i>	0,010*	0,003**
Triacilgliceróis (mg/dL)	<i>Coeficiente</i>	0,069	0,116
	<i>IC 95%</i>	-0,037 – 0,176	0,016 – 0,218
	<i>p-valor</i>	0,200	0,024*

* Correlação significativa ($p < 0,05$). ** Correlação significativa ($p < 0,005$).

IMC, índice de massa corporal; CC, circunferência da cintura; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; HDL-c, colesterol associado à lipoproteína de alta densidade; VLDL-c, colesterol associado à lipoproteína de muito baixa densidade; LDL-c, colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade.

Ainda no contexto da SM, observou-se que os indivíduos desta amostra que apresentavam SM tiveram maiores valores no SIS em comparação àqueles sem SM. Além disso, foi identificada uma correlação positiva entre SIS e vários fatores de risco metabólicos, incluindo IMC, circunferência da cintura, HOMA1-IR e concentrações de leptina. Por outro lado, dois miRNAs, miR-16 e miR-363, apresentaram correlação negativa com o SIS (Tabela 8).

Concentrações mais baixas de leptina foram observadas em homens e em participantes sem SM em comparação a mulheres e a indivíduos com SM, respectivamente. Ainda, foram observadas correlações positivas significativas entre as concentrações de leptina e fatores de risco metabólicos, como IMC, circunferência da cintura e HOMA1-IR. Além disso, a expressão plasmática de diversos miRNAs foi negativamente correlacionada à concentração plasmática de leptina, incluindo miR-16, miR-21, miR-28, miR-30d, miR-126, miR-130b, miR-140, miR-146a, miR-222, miR-223, miR-363, miR-375, miR-486 e miR-532. Apenas o miR-15a foi positivamente correlacionado com a concentração plasmática de leptina (Tabela 8).

Tabela 8 - Associações entre Escore de Inflamação Sistêmica de Baixo Grau (SIS) e concentração plasmática de leptina com variáveis de saúde em 193 idosos participantes do estudo de base populacional ISA-Nutrição.

Variáveis	Escore de Inflamação Sistêmica de baixo grau (SIS)		Leptina (ng/mL)	
	média ± SE	p-valor	média ± SE	p-valor
Sexo				
Masculino	-0,4046 ± 0,3920	0,0773	1,2348 ± 0,2276	<0,0001 [†]
Feminino	0,4950 ± 0,3400		7,0166 ± 0,5414	
Presença de SM				
Não	-0,7517 ± 0,4922	0,0230[†]	3,3378 ± 0,5785	0,04955[†]
Sim	0,4868 ± 0,3126		4,5956 ± 0,4741	
Variáveis	correlação	p-valor	correlação	p-valor
Idade (anos)	0,1312	0,0689	-0,0679	0,3484
IMC (kg/m ²)	0,2081	0,0037*	0,5046	< 0,0001*
Circunferência da cintura (cm)	0,2024	0,0048*	0,3185	< 0,0001*
PAS (mmHg)	-0,0230	0,7510	-0,0552	0,4459
PAD (mmHg)	0,0441	0,5424	0,0493	0,4957
HOMA1-IR	0,4339	< 0,001*	0,3511	< 0,0001*
Leptina (ng/mL)	0,3078	< 0,001*	-	-
miR-15a	-0,1180	0,1022	0,2669	0,0002*
miR-16	-0,1506	0,0366*	-0,2922	< 0,0001*
miR-21	-0,0391	0,5889	-0,2216	0,0020*
miR-28	-0,0985	0,1740	-0,1448	0,0446*
miR-30a	-0,0399	0,5818	-0,1361	0,0592
miR-30d	-0,0651	0,3686	-0,1963	0,0062*
miR-122	0,0110	0,8790	-0,0786	0,2774
miR-126	0,0184	0,7991	-0,1767	0,0139*
miR-130b	-0,1116	0,1294	-0,1614	0,0249*
miR-139	0,0791	0,4138	-0,0275	0,7038
miR-140	0,0018	0,9803	-0,1708	0,0176*
miR-146a	-0,0172	0,8128	-0,1431	0,0471*
miR-150	-0,0070	0,9230	0,0055	0,9393
miR-222	-0,1062	0,1417	-0,1871	0,0092*
miR-223	-0,0743	0,3047	-0,1742	0,0154*
miR-363	-0,1519	0,0350*	-0,2834	< 0,0001*
miR-375	-0,1220	0,0926	-0,1616	0,0255*
miR-376a	-0,0637	0,3788	-0,1294	0,0730
miR-486	-0,1001	0,1662	-0,2277	0,0014*
miR-532	-0,1213	0,0964	-0,2464	0,0006*
miR-let7c	0,0504	0,4865	-0,1037	0,1511

[†]Diferenças significativas no teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (p-valor < 0.05). *Coeficiente de correlação de Spearman significativo (p-valor < 0.05).

A fim de investigar as relações entre a expressão dos miRNAs, SIS e concentrações de leptina na amostra, foram utilizados MLGs. Tais resultados estão dispostos na Tabela 9.

A análise do MLG da expressão do miR-15a indica que um aumento de 1 ng/mL na concentração plasmática de leptina está associado a uma diminuição de 0,0269 no valor esperado da expressão plasmática do miR-15a. O MLG para miR-16 utilizou a função logarítmica como função de ligação e, portanto, os coeficientes devem ser interpretados como mudanças percentuais no valor esperado da expressão do miR-16. Assim, espera-se uma diminuição de 5,63% na expressão do miR-16 para cada aumento de 1 unidade no SIS e uma diminuição de 4,77% para cada aumento de 1 ng/mL na concentração plasmática de leptina. Ademais, o efeito da leptina na expressão plasmática do miR-16 depende do valor do SIS, com um aumento esperado de 0,81% no efeito da leptina para cada aumento de 1 unidade no SIS (Tabela 9).

A função de ligação inversa foi empregada no MLG usado para analisar a relação entre a expressão plasmática do miR-21 e os valores do SIS e concentração plasmática de leptina. Isto significa que um aumento unitário no SIS está associado a um aumento de 2,93% na expressão do miR-21. Curiosamente, o termo de interação entre SIS e concentração plasmática de leptina foi negativo (-0,0081), indicando que a associação positiva entre SIS e expressão de miR-21 enfraquece à medida que as concentrações de leptina aumentam (Tabela 9).

O modelo utilizado para analisar a expressão plasmática do miR-223 empregou a função *log link*. Os resultados indicaram que um aumento de 1 ng/mL na concentração plasmática de leptina está associado a uma diminuição de 4,87% no valor esperado da expressão do miR-223. Para os modelos que analisam a expressão de miR-363 e miR-532, foi utilizada a função de ligação de identidade. O coeficiente de leptina no modelo miR-363 sugere que o valor esperado do miR-363 diminui em 0,0385 para cada aumento de 1 ng/mL nos níveis de leptina. Da mesma forma, o modelo miR-532 indica que um aumento de 1 ng/mL na concentração plasmática de leptina está associado a uma diminuição de 0,0541 no valor esperado da expressão do miR-532 (Tabela 9).

Considerando as associações observadas nos MLGs entre a expressão dos miRNAs e os valores de SIS e leptina, e considerando que cerca de 65% da amostra apresenta SM, foi elaborado um esquema explicando como os miRNAs e suas relações com o SIS e com a concentração de leptina podem impactar o desenvolvimento de SM nos idosos (Figura 4).

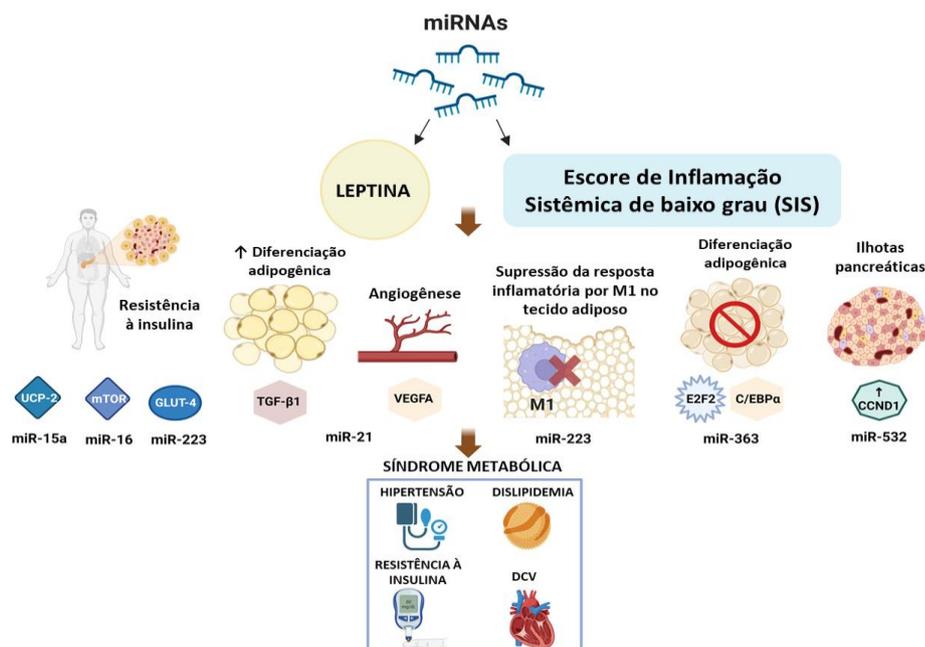
Tabela 9 - Resultados dos modelos lineares generalizados (MLGs) para a expressão dos miRNAs, concentrações de leptina e escore de inflamação sistêmica de baixo grau (SIS).

miRNA	Distribuição (link function)	Variável	Coefficiente	IC	p-valor
miR-15a	Gamma (identity)	Intercepto	1,2429	[1,0954, 1,3905]	<0,0001
		Leptina	-0,0269	[-0,0529, -0,0009]	0,0429
miR-16	Inverse Gaussian (log)	Intercepto	0,5014	[0,2975, 0,7053]	<0,0001
		SIS	-0,0563	[-0,0987, -0,0139]	0,0099
		Leptina	-0,0477	[-0,0840, -0,0114]	0,0106
miR-21	Inverse Gaussian (inverse)	SIS:Leptina*	0,0081	[0,0013, 0,0149]	0,0198
		Intercepto	0,7806	[0,6500, 0,9112]	<0,0001
		SIS	0,0293	[0,0004, 0,0582]	0,0471
miR-223	Inverse Gaussian (log)	Leptina	0,0280	[-0,0019, 0,0579]	0,0660
		SIS:Leptina*	-0,0081	[-0,0146, -0,0016]	0,0160
		Intercepto	0,6990	[0,3960, 1,0020]	<0,0001
miR-363	Inverse Gaussian (identity)	Leptina	-0,0487	[-0,0940, -0,0033]	0,0357
		Intercepto	1,3983	[1,1769, 1,6197]	<0,0001
miR-532	Inverse Gaussian (identity)	Leptina	-0,0385	[-0,0701, -0,0069]	0,0177
		Intercepto	1,6197	[1,2951, 1,9443]	<0,0001
miR-532	Inverse Gaussian (identity)	Leptina	-0,0541	[-0,0913, -0,0169]	0,0049
		Intercepto	1,6197	[1,2951, 1,9443]	<0,0001

*Interação entre SIS e Leptina.

Variáveis de sexo e presença de síndrome metabólica não foram significativas no MLG.

Figura 4 - Como os miRNAs e suas relações com o SIS e com as concentrações de leptina podem impactar o desenvolvimento da síndrome metabólica em idosos.



Criado com BioRender.com.

Legenda: UCP-2, uncoupling protein-2; mTOR, mammalian target of rapamycin; GLUT-4, glucose transporter type 4; TGF-β1, transforming growth factor beta; VEGFA, vascular endothelial growth factor A; M1, macrophage M1; E2F2, E2F transcription factor 2; C/EBPα, CCAAT enhancer-binding proteins; CCND1, Cyclin D1.

Adaptado de: Carvalho *et al.*, 2023

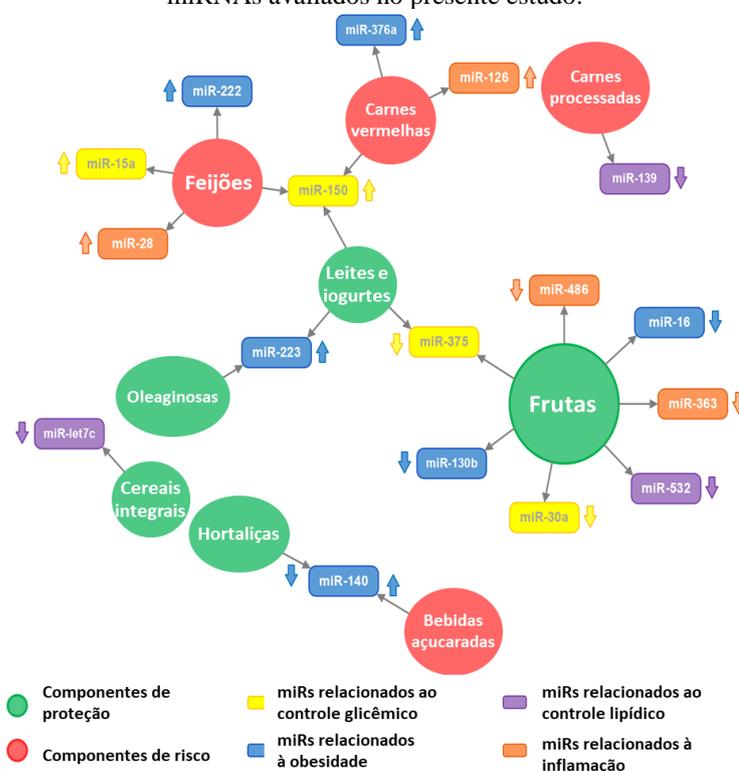
No que diz respeito aos dados de consumo alimentar, a Tabela 10 apresenta a mediana do consumo diário dos componentes alimentares estudados pelos idosos avaliados.

Tabela 10 - Consumo mediano (mín–máx) dos componentes alimentares estudados pelos idosos participantes do estudo de base populacional ISA-Nutrição.

Componente alimentar	Mediana (mín–máx)	Componente alimentar	Mediana (mín–máx)
Frutas (g/d)	128,1 (46,3–265,8)	Peixes e frutos do mar (g/d)	8,5 (4,1–67,0)
Hortaliças (g/d)	94,4 (48,2–158,7)	Leites e iogurte (mL/d)	165,0 (75,6–293,7)
Feijões e leguminosas (g/d)	103,2 (27,4–235,4)	Carnes vermelhas (g/d)	73,9 (42,6–90,4)
Oleaginosas e sementes (g/d)	1,0 (0,3–14,5)	Carnes processadas (g/d)	17,3 (13,8–39,5)
Cereais integrais (g/d)	4,1 (3,7–34,2)	Bebidas açucaradas (mL/d)	113,1 (47,0–448,4)

Além disso, MLGs também foram testados a fim de analisar como e quais componentes alimentares podem influenciar a expressão plasmática dos miRNAs estudados. Os resultados obtidos até o momento estão dispostos na Tabela 11. Além disso, os principais resultados estão representados na Figura 5 e na Tabela 11.

Figura 5 – Representação gráfica das principais associações encontradas entre os grupos alimentares e os miRNAs avaliados no presente estudo.



A direção das setas próximas aos miRNAs indicam como a sua expressão foi afetada pelo consumo dos componentes.

↑ Junto ao miRNA: indica que o consumo do componente alimentar impactou no aumento da expressão do miRNA.

↓ Junto ao miRNA: indica que o consumo do componente alimentar impactou na redução da expressão do miRNA

Tabela 11 - Resultados dos modelos lineares generalizados (MLGs) para a expressão dos miRNAs e consumo dos componentes alimentares.

miRNA	Distribuição (link function)	Variável	Coefficiente	IC	p-valor
miR-15a	Gamma (log)	Intercepto	-0,2346	[-0.5653, 0.0961]	0,1619
		Feijões	0,0034	[0.0006, 0.0063]	0,0175
miR-16	Gamma (log)	Intercepto	1,0183	[0.4808, 1.5559]	0,0003
		Frutas	-0,0052	[-0.0089, -0.0014]	0,0083
miR-28	Gamma (log)	Intercepto	-0,2662	[-0.8900, 0.3577]	0,3983
		Feijões	0,0067	[0.0004, 0.0131]	0,0386
miR-30a	Inverse Gaussian (log)	Intercepto	0,4994	[0.2178 0.781]	< 0,001
		Frutas	-0,0030	[-0.0051 -0.001]	< 0,001
miR-126	Gamma (identity)	Intercepto	0,4495	[-0.5271, 1.4261]	0,3624
		Frutas	-0,0038	[-0.0064, -0.0013]	0,0035
		Carnes vermelhas	0,0170	[0.0042, 0.0298]	0,0098
miR-130b	Gamma (log)	Intercepto	1,0082	[0.4885, 1.5279]	0,0002
		Frutas	-0,0053	[-0.0086, -0.0021]	0,0017
miR-139	Gamma (log)	Intercepto	1,0651	[0.2683, 1.8619]	0,0098
		Carnes processadas	-0,0451	[-0.0834, -0.0068]	0,0221
miR-140	Gamma (log)	Intercepto	0,6959	[-0.0142, 1.4059]	0,0547
		Hortalças	-0,0083	[-0.0151, -0.0015]	0,0177
		Bebidas açuc.	0,0030	[0.0008, 0.0052]	0,0078
miR-150	Gamma (identity)	Intercepto	-0,4589	[-1.2494, 0.3316]	0,2514
		Leites e iogurte	0,0024	[0.0002, 0.0045]	0,0305
		Feijões	0,0044	[0.0002, 0.0087]	0,0421
miR-222	Gamma (log)	Carnes vermelhas	0,0105	[0.0008, 0.0202]	0,0340
		Intercepto	-0,1878	[-0.5984, 0.2228]	0,3653
		Feijões	0,0040	[0.0004, 0.0076]	0,0284
miR-223	Gamma (log)	Intercepto	-2,0154	[-3.5525, -0.4782]	0,0109
		Leites e iogurte	0,0036	[0.0000, 0.0071]	0,0477
		Carnes vermelhas	0,0219	[0.0013, 0.0424]	0,0372
miR-363	Gamma (log)	Oleaginosas	0,2021	[0.0409, 0.3632]	0,0147
		Intercepto	0,6976	[0.2496, 1.1457]	0,0027
miR-375	Gamma (log)	Frutas	-0,0038	[-0.0070, -0.0006]	0,0218
		Intercepto	0,0821	[-0.4918, 0.6560]	0,7765
miR-376a	Gamma (log)	Frutas	-0,0045	[-0.0081, -0.0008]	0,0165
		Leites e iogurte	0,0039	[0.0009, 0.0069]	0,0116
miR-486	Gamma (log)	Intercepto	-1,094	[-2.3504, 0.1624]	0,0870
		Carnes vermelhas	0,021	[0.0041, 0.0379]	0,0159
miR-532	Gamma (log)	Intercepto	0,6600	[0.3074, 1.0125]	0,0004
		Frutas	-0,0039	[-0.0065, -0.0013]	0,0036
miR-let7c	Gamma (log)	Intercepto	1,0319	[0.4935, 1.5703]	0,0003
		Frutas	-0,0055	[-0.0094, -0.0016]	0,0068
		Intercepto	0,3463	[0.1333, 0.5592]	0,0018
		Cereais integrais	-0,0245	[-0.0441, -0.0049]	0,0148

A partir dos resultados mostrados na Tabela 11 e na Figura 4, observa-se que o consumo de diversos grupos alimentares foi capaz de influenciar a expressão plasmática de diferentes miRNAs, com destaque para o grupo das frutas, cujos resultados nos permitem a interpretação de que o consumo diário de 100 gramas foi relacionado à redução da expressão de oito miRNAs (miR-16, miR-30a, miR-126, miR-130b, miR-363, miR-375, miR-486, miR-532). Por outro lado, o consumo diário de 100 gramas de carne vermelha foi associado a um aumento na expressão plasmática de quatro miRNAs (miR-126, miR-150, miR-223 e miR-376a).

Por fim, analisou-se ainda se o consumo desses componentes alimentares variou de acordo com a presença ou não da SM (Tabela 12).

Tabela 12 - Resultados dos modelos lineares generalizados (MLGs) ajustados para a presença da síndrome metabólica.

	Modelo	Variável	Coefficiente	IC	p-valor
Presença de	Logístico	Intercepto	2,5448	[0,7798, 4,3098]	0,0053
SM		Hortaliças	-0,0198	[-0,0377, -0,0019]	0,0310

Conforme apresentado na tabela acima, observou-se diferença significativa de acordo com a SM somente para o consumo de hortaliças, indicando que um aumento de 100 g na ingestão diária de hortaliças está associado à uma chance 7 vezes maior de não possuir SM no grupo estudado. Os demais componentes alimentares não foram significativos (Tabela 10).

Além dos resultados apresentados, os potenciais alvos biológicos dos miRNAs com resultados significativos nos MLGs foram preditos e estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13 - Potenciais alvos biológicos para os miRNAs avaliados.

miRNA	Potencial alvo	Funções
miR-15a	VEGFA	Este gene é um membro da família do fator de crescimento PDGF/VEGF. Ele codifica uma proteína de ligação à heparina, que existe como um homodímero ligado por dissulfeto. Este fator de crescimento induz a proliferação e migração de células endoteliais vasculares e é essencial para a angiogênese fisiológica e patológica.
	UCP2	As proteínas desacopladoras mitocondriais (UCP) são membros de uma família maior de proteínas transportadoras de ânions mitocondriais. As UCPs separam a fosforilação oxidativa da síntese de ATP com energia dissipada como calor, também conhecida como dissipação do gradiente de prótons. Este gene é expresso em muitos tecidos, com maior expressão no músculo esquelético. Acredita-se que desempenhe um papel na termogênese, obesidade e diabetes.

Tabela 13 (continuação) - Potenciais alvos biológicos para os miRNAs avaliados.

miRNA	Potencial alvo	Funções
miR-16	IGF1	A proteína codificada por este gene é semelhante à insulina em função e estrutura e é membro de uma família de proteínas envolvidas na mediação do crescimento e desenvolvimento. A proteína codificada é processada a partir de um precursor, ligada a um receptor específico e secretada. Defeitos neste gene são uma causa da deficiência do fator de crescimento I semelhante à insulina.
	INSR	Este gene codifica um membro da família de proteínas receptoras da tirosina quinase. A pré-proteína codificada é processada proteoliticamente para gerar subunidades alfa e beta que formam um receptor heterotetramérico. A ligação da insulina ou de outros ligantes a esse receptor ativa a via de sinalização da insulina, que regula a captação e liberação de glicose, bem como a síntese e armazenamento de carboidratos, lipídios e proteínas.
	IRS1	Este gene codifica uma proteína que é fosforilada pelo receptor de insulina tirosina quinase. Mutações neste gene estão associadas ao diabetes tipo 2 e à suscetibilidade à resistência à insulina.
miR-21	TGF- β 1	Este gene codifica um ligante da superfamília de proteínas TGF-beta (fator de crescimento transformador beta). Esta proteína codificada regula a proliferação, diferenciação e crescimento celular e pode modular a expressão e ativação de outros fatores de crescimento, incluindo interferon-gama e fator de necrose tumoral alfa.
	VEGFA	Ver acima.
miR-30a	SLC2A12	Este gene é um transportador facilitador de glicose independente da insulina que pertence a uma família de transportadores que catalisam a captação de glicose por difusão facilitada. Além disso, este gene regula a capacidade oxidativa mitocondrial em adipócitos humanos.
	FOXO1	Este gene pertence à família forkhead de fatores de transcrição que são caracterizados por um domínio forkhead distinto. Este gene pode desempenhar um papel no crescimento e diferenciação miogênica. A proteína FOXO1 regula o metabolismo celular no fígado, músculo, tecido adiposo e pâncreas. Alterações na função do FOXO1 podem resultar em distúrbios metabólicos, incluindo diabetes.
	IRS-1	Este gene codifica uma proteína que é fosforilada pelo receptor de insulina tirosina quinase. Mutações neste gene estão associadas ao diabetes tipo II e à suscetibilidade à resistência à insulina. Entre suas vias relacionadas estão as vias de sinalização da IL-9 e a cascata de sinalização do receptor de insulina.
miR-122	G6PC	Este gene (G6PC) é um dos três genes que codificam a subunidade catalítica da glicose-6-fosfatase em humanos: G6PC, G6PC2 e G6PC3. A glicose-6-fosfatase é uma enzima chave na homeostase da glicose, atuando na gliconeogênese e na glicogenólise.
	PPKAB1	Subunidade reguladora da AMPK, que é um heterotrímero com uma subunidade catalítica alfa e subunidades beta e gama não catalíticas.
miR-223	SLC2A4	Este gene é membro da família 2 de transportadores de soluto (transportador facilitado de glicose) e codifica uma proteína que funciona como um transportador facilitador de glicose regulado por insulina (GLUT4).
	IRS1	Ver acima.
miR-363	LEP	Este gene codifica uma proteína secretada pelos adipócitos brancos na circulação e desempenha um papel importante na regulação da homeostase energética. A leptina circulante liga-se ao receptor de leptina no cérebro, que ativa vias de sinalização à jusante que inibem a alimentação e promovem o gasto de energia. Esta proteína também possui diversas funções endócrinas e está envolvida na regulação das respostas imunológicas e inflamatórias, hematopoese, angiogênese, reprodução, formação óssea e cicatrização de feridas.

Tabela 13 (continuação) - Potenciais alvos biológicos para os miRNAs avaliados.

miRNA	Potencial alvo	Funções
miR-363	C/EBP α	Este gene “ <i>intronless</i> ” codifica um fator de transcrição que contém um domínio básico de zíper de leucina (bZIP) e reconhece o CCAAT nos promotores dos genes alvo. A proteína codificada funciona em homodímeros e heterodímeros com CCAAT/proteínas de ligação ao intensificador beta e gama. A atividade desta proteína pode modular a expressão de genes envolvidos na regulação do ciclo celular e na homeostase do peso corporal.
	E2F2	A proteína codificada por este gene é um membro da família E2F de fatores de transcrição. A família E2F desempenha um papel crucial no controle do ciclo celular e na ação de proteínas supressoras de tumor e também é alvo de proteínas transformadoras de pequenos vírus tumorais de DNA.
miR-532	CCND1	A proteína codificada por este gene pertence à família altamente conservada das ciclinas. As ciclinas funcionam como reguladores das quinases CDK. Diferentes ciclinas exibem padrões distintos de expressão e degradação contribuindo para a coordenação temporal de cada evento mitótico. Esta ciclina forma um complexo e funciona como uma subunidade reguladora de CDK4 ou CDK6, cuja atividade é necessária para a transição G1/S do ciclo celular.
	IRS2	Este gene codifica o substrato 2 do receptor de insulina, uma molécula de sinalização citoplasmática que medeia os efeitos da insulina, do fator de crescimento semelhante à insulina 1 e de outras citocinas, agindo como um adaptador molecular entre diversos receptores de tirosina quinases e efetores à jusante. O produto deste gene é fosforilado pelo receptor tirosina quinase da insulina após estimulação do receptor.
	LEP	Ver acima.

VEGFA, Fator de crescimento do endotélio vascular A; UCP2, Proteína desacopladoras-2; IGF1, Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; INSR, Receptor de Insulina; IRS1, Substrato do Receptor de Insulina 1; TGF- β 1, Fator de transformação do crescimento beta 1; SLC2A4, Membro 4 da família de transportadores de soluto; LEP, Leptina; C/EBP α , *CCAAT/enhancer-binding protein alpha*; E2F2, Fator de transcrição E2F 2; CCND1; Ciclina D1; IRS2, Substrato do Receptor de Insulina 2.

5 DISCUSSÃO

Parte dos resultados obtidos no presente trabalho já se encontram publicados na literatura (CARVALHO et al., 2023a; 2023b), e as referências estão anexadas no final do trabalho (Apêndice A e Apêndice B). Os resultados apresentados a partir da Tabela 8 não foram publicados até o presente momento.

De acordo com os resultados deste trabalho, a maioria dos idosos foi diagnosticada com SM e resistência à insulina. Notavelmente, indivíduos com SM apresentaram deficiente controle glicêmico e lipídico, conforme indicado pelos elevados valores de VLDL-c, colesterol não HDL, triacilgliceróis, glicemia de jejum, insulina de jejum, HOMA-IR e valores reduzidos de HDL-c. Em adição, indivíduos com SM apresentaram maiores valores no SIS e maiores concentrações de leptina. Em relação aos miRNAs circulantes, foi observada expressão alterada no miR-30a e no miR-122, quando a expressão desses miRNAs foi avaliada de acordo com o *status* de SM, apresentando correlações com a pressão arterial diastólica e biomarcadores relacionados ao metabolismo glicêmico e lipídico. Além disso, a expressão plasmática de 15 miRNAs se correlacionou com valores de SIS e com a leptina.

A hipertrofia e a hiperplasia dos adipócitos presentes na obesidade estão associadas à resistência à insulina, que é um dos principais fatores que desencadeiam distúrbios metabólicos que culminam em SM e DCNT (ZHU; WANG, 2011). A SM é caracterizada por uma combinação de fatores que podem aumentar o risco de eventos cardiovasculares, diabetes tipo 2 e outras condições clínicas (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2006), e sua fisiopatologia é caracterizada pela presença de um processo inflamatório sistêmico e de baixo grau (AWAN; GENEST, 2015; CHEN et al., 2015; LEÓN-PEDROZA et al., 2014; NORDE et al., 2020). A expansão do tecido adiposo branco promove a secreção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α e IL-6), o que favorece o aumento da síntese hepática de proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa, bem como o aumento da expressão de quimiocinas promove maior infiltração de macrófagos e linfócitos T no tecido adiposo branco (LEÓN-PEDROZA et al., 2014; VAN GREEVENBROEK et al., 2013; WEISBERG et al., 2003). Tais fatos desencadeiam um estado de inflamação crônica, sistêmica e de baixa intensidade, que é denominada inflamação metabólica (DALI-YOUCHEF et al., 2013; MAHDAVI et al., 2018).

Nesse contexto, estudos têm evidenciado a presença de alterações na expressão de miRNAs em indivíduos com obesidade, inflamação sistêmica, crônica e de baixo grau e

resistência à insulina (CARVALHO *et al.*, 2023; MA *et al.*, 2011; MA *et al.*, 2018; ORTEGA *et al.*, 2013; SIMIONESCU *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2015), podendo assim ser considerados potenciais biomarcadores para DCNT e SM. Corroborando com a literatura, alterações na expressão plasmática de miRNAs observadas em indivíduos com SM do presente estudo podem estar associadas a variáveis antropométricas e a biomarcadores glicêmicos, lipídicos e inflamatórios (DONGHUI *et al.*, 2019; ORTEGA *et al.*, 2014). Ademais, foram observadas concentrações plasmáticas elevadas de leptina em idosos com maiores valores de SIS. A leptina é um hormônio que atua na sinalização da adiposidade, além de ser crucial na regulação da ingestão alimentar e do gasto energético, induzindo anorexia e aumento da taxa metabólica (SAHU, 2004; STEINER *et al.*, 2007). No entanto, um estudo anterior mostrou que a sensibilidade a esse hormônio diminui com o ganho de gordura corporal relacionado à idade (MYERS *et al.*, 2012). Assim, tal ganho de gordura corporal traz um quadro progressivo de resistência periférica e central à ação da leptina (LÉON-PEDROZA *et al.*, 2014; SAHU, 2004).

Além disso, as concentrações de leptina foram maiores em indivíduos com SM do que naqueles sem SM e, quando observadas de acordo com o sexo, as mulheres apresentaram concentrações de leptina mais elevadas do que os homens. Um estudo realizado na população sueca, incluindo 95 indivíduos de ambos os sexos, obesos ($IMC > 27 \text{ kg/m}^2$) e não obesos, mostrou que as mulheres apresentavam maior percentual de gordura corporal e maior concentração sérica de leptina do que os homens (HELLSTRÖM *et al.*, 2000). Essas diferenças significativas permaneceram quando apenas indivíduos obesos foram avaliados (HELLSTRÖM *et al.*, 2000). Além disso, ao avaliar a secreção de leptina pelo tecido adiposo, de acordo com a presença ou ausência de obesidade, observou-se que mulheres obesas apresentavam secreção de leptina significativamente maior em comparação aos homens obesos (HELLSTRÖM *et al.*, 2000). Esse fato decorre dos diferentes padrões de deposição de gordura nas mulheres (MAZUSAKI *et al.*, 1995; MONTAGUE *et al.*, 1998), além da influência dos hormônios sexuais (CASABIELL *et al.*, 1998; PIÑEIRO *et al.*, 1999; ROSEMBAUM; LEIBEL, 1999).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 2, os idosos com diagnóstico de SM apresentaram maior expressão plasmática do miR-30a e do miR-122. Weale *et al.* (2020) verificaram maior expressão de miR-30a em indivíduos adultos com pré-diabetes ou diabetes tipo 2 do que em indivíduos normoglicêmicos. No presente estudo, o miR-30a foi mais expresso em indivíduos com SM do que naqueles sem SM. O miR-30a regula a capacidade oxidativa mitocondrial em adipócitos humanos, provavelmente aumentando a expressão de genes envolvidos na via de sinalização da insulina e no metabolismo oxidativo. Em camundongos

diabéticos, observou-se que o aumento da expressão do miR-30a promove o “escurecimento” do tecido adiposo branco, aumenta a sensibilidade à ação da insulina e estimula a expressão de genes relacionados ao gasto energético (KOH et al., 2016).

Além disso, foi observado que o miR-30a tem como genes alvo a proteína FOXO1 e o substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1). Esses genes estão relacionados à disfunção das células beta pancreáticas e à resistência hepática e periférica à ação da insulina, pois interferem na sinalização da insulina e na resposta à glicotoxicidade (COPPS et al., 2012; EBRAHIMI et al., 2019; FURUYAMA et al., 2003). Além disso, o gene IRS-1, cuja expressão pode ser reduzida com o aumento da expressão do miR-30a-5p, está envolvido no metabolismo glicêmico e lipídico, o que pode acarretar resistência hepática à insulina e à hiperlipidemia (SUD et al., 2017).

No que diz respeito ao miR-122, este foi o primeiro miR a ser associado ao controle metabólico. É expresso principalmente no fígado e, inicialmente, demonstrou afetar o colesterol hepático e o metabolismo dos ácidos graxos em camundongos (ESAU et al., 2006). No presente estudo, esse miR apresentou maior expressão em indivíduos com SM e se correlacionou positivamente com glicemia, insulinemia, HOMA-IR, LDL-c e colesterol não HDL. Wang et al. (2014) observaram maior expressão do miR-122 em indivíduos com obesidade em relação àqueles com peso adequado ou com sobrepeso, além de estar correlacionado positivamente com IMC, triglicerídeos e HOMA-IR, e negativamente correlacionado com HDL-c. Além disso, Willeit et al. (2017) observaram uma associação entre a expressão do miR-122 e o risco de SM e início recente de diabetes tipo 2 em um estudo que avaliou 810 participantes com idade média de 63 anos.

Os principais alvos do miR-122 são *G6PC* e *PPKABI*. O primeiro gene codifica a enzima glicose-6-fosfatase em humanos, que é uma enzima chave na homeostase glicêmica (VARGA et al., 2019). Estudos mostraram correlações entre alta expressão de miR-122 e resistência à insulina em indivíduos com diabetes tipo 2 ou resistência à insulina (SHAH et al., 2017). Além disso, no presente estudo, o *PPKABI* foi identificado como um alvo potencial do miR-122, o qual é uma subunidade da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), um regulador chave da resistência à insulina no músculo (SHAH et al., 2017). Considerando que os principais alvos encontrados para este miR estão relacionados à homeostase da glicose, os resultados do presente estudo são consistentes com os resultados da literatura.

Além disso, o miR-122 desempenha papel fundamental na regulação da fibrose cardiovascular e da função endotelial em indivíduos com diagnóstico de hipertensão (SONG et al., 2020). O miR-122 foi regulado positivamente em indivíduos com hipertensão, indicando

seu papel como fator de risco preditivo na homeostase e distúrbios cardiovasculares (ZHANG et al., 2020). O miR-122 é um marcador conhecido de eventos cardiovasculares, além de ser considerado adequado preditor de aterosclerose. Dados da literatura mostraram que o *knockdown* do miR-122 em células endoteliais aórticas – as quais tiveram a expressão deste miRNA induzida pelo tratamento com LDL-oxidada – suprimiu a apoptose dessas células, sugerindo um papel pró-apoptótico do miR-122 em células endoteliais aórticas humanas sob condição aterogênica. (LI et al., 2019).

A partir dos resultados apresentados na Tabela 7, a expressão plasmática de seis miRNAs (miR-15a, miR-16, miR-21, miR-223, miR-363 e miR-532) apresentou correlação com as concentrações de leptina e/ou valores do SIS. A expressão do miR-15a foi negativamente associada às concentrações de leptina. Deve-se notar que a hiperleptinemia é um evento comum à obesidade e à resistência à insulina, uma vez que a obesidade desencadeia concentrações aumentadas de leptina, a qual atua como uma citocina pró-inflamatória que amplifica o processo de resistência à insulina (KUMAR et al., 2020; LÓPEZ-JARAMILLO et al., 2014). Nesse sentido, o miR-15a tem atuado na regulação positiva da biossíntese de insulina ao inibir a proteína desacopladora 2 (UCP2) – proteína com importante papel na resistência à insulina – aumentando a concentração intracelular de ATP nas ilhotas e favorecendo a secreção de insulina induzida por glicose (CHAN et al., 2001; SUN et al., 2011).

O miR-16 correlacionou-se negativamente com as concentrações de SIS e leptina, e quando testado no MLG, observou-se que a redução na sua expressão era esperada a cada aumento de 1 unidade no SIS e de 1 ng/mL na concentração de leptina. Semelhante ao miR-15a, estudos demonstraram a ação do miR-16 em relação à sensibilidade à insulina (LEE et al., 2016; MA; FU; GARVEY, 2018). Estudo realizado com indivíduos americanos mostrou associação positiva entre a expressão plasmática do miR-16 e a taxa de utilização de glicose, indicando assim que quanto maior a expressão do miR-16, maior será a sensibilidade à ação da insulina nos indivíduos avaliados (MA; FU; GARVEY, 2018). Resultados semelhantes foram observados em um estudo com ratos com obesidade induzida por ração com alto teor de lipídios, a qual induziu resistência à insulina e redução na expressão do miR-16 no músculo esquelético (LEE et al., 2016). Este estudo também mostrou que o miR-16 ajuda a controlar a síntese proteica estimulada pela insulina no músculo esquelético, regulando a proteína mTOR (LEE et al., 2016). Considerando que o miR-16 possui vários genes-alvo relacionados à sinalização da insulina, os resultados do presente estudo evidenciam o importante papel desse miRNA na condição de resistência à insulina (LEE et al., 2016; MA; FU; GARVEY, 2018).

A inflamação crônica, sistêmica e de baixo grau pode ser ativamente regulada por miRNAs, que podem atuar como reguladores epigenéticos afetando a adipogênese, a diferenciação de adipócitos, o metabolismo lipídico, o escurecimento do tecido adiposo branco, a homeostase da glicose e a resistência à insulina, podendo assim influenciar o desenvolvimento e a progressão da obesidade e outras DNT (HEYN et al., 2020). O presente estudo observou que o aumento do SIS estava associado ao aumento da expressão do miR-21, que foi regulado positivamente em diversas doenças, como obesidade e diabetes tipo 2 (SEKAR et al., 2014). Um estudo realizado com ratos mostrou que o miR-21 foi regulado positivamente no tecido adiposo branco epididimal de ratos obesos em comparação com ratos não obesos (KELLER et al., 2011), enquanto um estudo realizado em humanos mostrou maior expressão de miR-21 no tecido adiposo subcutâneo de pessoas com obesidade e diabetes tipo 2 quando comparadas com indivíduos com obesidade e sem diabetes tipo 2 (GUGLIELMI et al., 2017).

O miR-21 está relacionado ao aumento da diferenciação de adipócitos por meio da modulação da sinalização do fator transformador de crescimento beta 1 (TGF- β 1) (JEONG KIM et al., 2009), além de desempenhar papel crucial na angiogênese, por meio da regulação do VEGFA, conhecido por ser um regulador da termogênese (RICHART et al., 2014). Ambos os fatores de crescimento acima são alvos potenciais do miR-21, indicando assim um papel crucial para este miRNA na obesidade, diabetes tipo 2 e resistência à insulina (LHAMYANI et al., 2020).

A expressão plasmática do miR-223 foi negativamente correlacionada com as concentrações de leptina nos indivíduos avaliados neste estudo. O miR-223 controla a polarização dos macrófagos, alterando seus fenótipos e modulando a secreção de moléculas inflamatórias no tecido adiposo (HEYN et al., 2020; ZHUANG et al., 2012). Assim, o mecanismo anti-inflamatório descrito para o miR-223 é a supressão da resposta pró-inflamatória clássica de macrófagos M1 no tecido adiposo branco (ZHUANG et al., 2012). Um estudo realizado com humanos de 40 a 60 anos mostrou que a expressão plasmática do miR-223 foi menor em indivíduos com sobrepeso e obesidade em relação àqueles com peso adequado (WEN; QIAO; WANG, 2015). Além disso, genes relacionados ao metabolismo da glicose, como *IRS1* e *GLUT4*, foram encontrados como potenciais alvos do miR-223. A desregulação na expressão deste miRNA pode inibir a cascata de sinalização da insulina, o que pode resultar em resistência à insulina e diabetes tipo 2 (CHAKRABORTY et al., 2014; IMPROTA-CARIA et al., 2022).

No presente estudo, o miR-363 foi negativamente correlacionado com o SIS e a concentração de leptina, e esta associação negativa com a concentração de leptina também foi

observada no GLM. O miR-363 inibe a diferenciação de adipócitos por meio do gene alvo do *E2F Transcription Factor 2* (E2F2) e a concomitante regulação negativa da *CCAAT/enhancer-binding protein alpha* (C/EBP α) e do *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ) (CHEN et al., 2014). Foi demonstrado que C/EBP α , que desempenha um papel na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros, modifica a expressão do gene da leptina, desempenhando um papel central na homeostase do peso corporal (LINHART et al., 2001). Por sua vez, C/EBP α ativa o gene *PPARG*, promovendo a adipogênese (TANG; LANE, 2012). Assim, C/EBP α e PPAR γ promovem a expressão de genes envolvidos na sensibilidade à insulina, lipogênese e lipólise (IACOMINO; SIANI, 2017).

Ainda, neste trabalho, a expressão do miR-532 foi negativamente correlacionada com as concentrações de leptina. Um estudo realizado com homens com idade média de 50 anos mostrou menor expressão plasmática de miR-532 no grupo obeso em comparação ao grupo não obeso (ORTEGA et al., 2012). Um gene alvo potencial para o miR-532 foi o gene da ciclina D1 (CCND1), um membro da família da ciclina e regulador da quinase dependente da ciclina (ZHONG; SU; CHEN, 2021). A expressão de CCND1 é regulada positivamente em ilhotas pancreáticas de indivíduos com diabetes tipo 2 (TANEERA et al., 2013), e este gene tem sido associado a vias metabólicas como a via das pentoses-fosfato e a glicólise, podendo dessa forma estar envolvido no desenvolvimento de diabetes tipo 2 relacionado à obesidade (ORTEGA et al., 2012; SHEN; ZHU, 2018; WU et al., 2023).

Sabe-se que a adoção de um padrão alimentar saudável está intimamente relacionada à redução do risco de desenvolvimento de DCNT, como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e câncer (WHO, 2019). A *World Health Organization* (WHO, 2019) preconiza o consumo diário de, pelo menos, 400 gramas (equivalente a 5 porções) de frutas e hortaliças, excluindo batatas e outros tubérculos. No presente estudo, os idosos avaliados tiveram um consumo de pouco mais da metade desta recomendação (222,5 gramas/dia), indicando consumo inadequado destes grupos alimentares. Além disso, é recomendado ainda o consumo de 10% ou menos da ingestão calórica total advinda de açúcares livres, presentes, por exemplo, em alimentos e bebidas açucaradas, o que equivale a, aproximadamente, 50 gramas de açúcares para indivíduos com peso corporal saudável e que consumam cerca de 2000 kcal por dia (WHO, 2019). Considerando que quase metade da população avaliada neste estudo apresentava sobrepeso/obesidade, e que teve consumo mediano de mais de 100 mL/dia de bebidas açucaradas, os indivíduos avaliados mostraram consumo elevado desse componente alimentar.

Ademais, uma meta-análise de estudos prospectivos investigou os efeitos do consumo de carnes na mortalidade por doenças cardiovasculares, e demonstrou que o consumo diário de 50

gramas de carne processada e de 100 gramas de carne vermelha aumentou em 25% e 15% o risco de mortalidade por DCV, respectivamente (ABETE et al., 2014). Tendo em vista que o consumo mediano destes componentes alimentares na amostra do presente estudo está próximo aos valores supracitados, é essencial que atenção seja dada ao consumo desses grupos alimentares.

Sabe-se que a alimentação pode modular a expressão de miRNAs e seus alvos de mRNA em diversos processos (apoptose, regulação do ciclo celular, angiogênese e inflamação) (SHAH; DAVIDSON; CHAPKIN, 2012). Assim, ao avaliar quais componentes alimentares puderam influenciar a expressão plasmática dos 21 miRNAs estudados, os MLGs mostraram que o consumo de praticamente todos os grupos alimentares foi capaz de influenciar a expressão plasmática de algum miRNA, com exceção do grupo de “Peixes e Frutos do mar”, o qual não apresentou associação com nenhum dos miRNAs avaliados.

No presente estudo, os grupos de “Frutas” e “Hortaliças” apresentaram, em seu total, associações com a expressão plasmática de nove miRNAs, sendo que o seu consumo diário de 100 gramas se associou a redução da expressão do miR-16, miR-30a, miR-126, miR-130b, miR-363, miR-375, miR-486 e miR-532 (Frutas), e miR-140 (Hortaliças). Estudos abordando associações entre a expressão de miRNAs circulantes específicos e consumo alimentar ainda são escassos na literatura. Frutas e hortaliças são as principais fontes de vitaminas e minerais (SLAVIN; LLOYD, 2012), e diversos estudos têm mostrado como estes nutrientes podem modular a expressão de diversos miRNAs no contexto da redução do risco de doenças cardiovasculares (DAMBAL et al., 2017; KARKENI et al., 2018; SCHULTE et al., 2017; ZELJIC et al., 2017).

Estudos realizados por Rimbach *et al.* (2010) e Gaedicke *et al.* (2008) mostraram regulação positiva do miR-122a e miR-125b em células hepáticas sob deficiência de vitamina E, ou seja, a ingestão de vitamina E pode ser considerada benéfica para a saúde humana. Os autores justificam esses resultados pelo fato de que os miRNAs avaliados serem, principalmente, relevantes na modulação do metabolismo lipídico e da resposta inflamatória (GAEDICKE et al., 2008; RIMBACH et al., 2010). Além disso, a suplementação de selênio e coenzima Q10, por 4 anos, em 443 indivíduos saudáveis, alterou a expressão de, pelo menos, 70 miRNAs, entre eles o miR-29b, o miR-30 e o miR-19, estando todos eles associados à ocorrência de doenças cardiovasculares ou câncer (ALEHAGEN et al., 2017).

Além disso, estudo realizado com ratos propôs a administração de tomate e do seu constituinte licopeno (carotenoide encontrado em frutas e vegetais de cor vermelha) após a ocorrência de um infarto agudo do miocárdio (PEREIRA et al., 2017). Observou-se efeitos benéficos contra a fibrose, além de redução na expressão de oito miRNAs (miR-29, miR-194, miR-503, miR-20a, miR-30a, miR-192, miR-30e e miR-126) após a administração de licopeno,

o que sugere que a ingestão do licopeno poderia ter um efeito benéfico contra o infarto agudo do miocárdio mediante alteração na expressão de miRNAs (PEREIRA et al., 2017).

Além de apresentar associação negativa com a expressão plasmática do miR-140, o consumo do grupo alimentar de “Hortaliças” apresentou associação com a SM, resultado observado na regressão logística, a qual indicou que um aumento de 100 g na ingestão diária de hortaliças está associado à uma chance sete vezes maior de não possuir SM no grupo de idosos estudado. Conforme bem estabelecido na literatura, uma meta-análise indicou que o consumo de frutas e de hortaliças foi inversamente associado ao risco de desenvolver SM (TIAN et al., 2018). Frutas e hortaliças são componentes essenciais da dieta e têm sido relatados como tendo muitos benefícios potenciais à saúde, uma vez que são ricos em fibras, minerais, vitaminas e fitoquímicos. Além disso, antioxidantes e componentes anti-inflamatórios de frutas e hortaliças, como vitaminas C e E, Mg, K, ácido fólico e fitoquímicos desempenham importante papel na SM (QIAO; GROUP, 2006). Uma maior ingestão de antioxidantes pode reduzir as espécies reativas de oxigênio e melhorar o *status* antioxidante em modelos humanos e animais (BOKOV; CHAUDHURI; RICHARDSON, 2004; QIAO; GROUP, 2006).

No presente estudo, o consumo de 100 gramas de “Feijões e leguminosas” foi associado ao aumento na expressão plasmática de quatro miRNAs (miR-15a, miR-28, miR-150, miR-222). Em contrapartida, o consumo de 100 gramas de “Cereais integrais” se associou negativamente à expressão do miR-let7c. Cereais integrais, feijões e leguminosas são as principais fontes de fibras dietéticas (MULLINS; ARJMANDI, 2021; PRASADI; JOYE, 2020). Esse nutriente tem sido visto como benéfico à saúde humana, podendo atuar na modulação de miRNAs (KURA et al., 2019). Estudo que avaliou a expressão de miRNAs em células humanas de câncer de cólon mostraram redução da expressão de miRNAs como o miR-17 e miR-93 – os quais são amplamente expressos no corações e alterados na doença arterial coronariana (DA COSTA MARTINS, et al., 2010; SCHULTE; KARAKAS; ZELLER, 2017; ZHANG; PRICE; FERNÁNDEZ-HERNANDO, 2019) – na presença de butirato, metabólito da fibra alimentar (HU et al., 2011).

Em adição, no presente estudo, associações positivas foram observadas entre o consumo de “Oleaginosas” e miR-223. Entre os componentes nutricionais cardioprotetores que podem afetar a expressão de miRNAs estão os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) ômega-3 e ômega-6 (ZHENG et al., 2015), os quais estão presentes nas oleaginosas (ROS; MATAIX, 2007). Observou-se que os PUFAs regularam negativamente o miRNA-146a em células endoteliais com inflamação induzida por lipopolissacarídeo (ROESSLER et al., 2017). Os PUFAs ômega-3 foram capazes de reverter um aumento da expressão de miRNA-21 induzido

pela angiotensina II em fibroblastos cardíacos de camundongos, podendo, portanto, exercer potenciais efeitos benéficos na fibrose cardíaca (SIDDESHA et al., 2014). O miRNA-21 também está relacionado com DCV e inflamação (KURA et al., 2017). Dietas com alto teor de PUFAs regularam negativamente o miRNA-21, o que reduz a sinalização pró-inflamatória (PALMER et al., 2014). Por outro lado, Ortega *et al.* (2015) observaram alterações na expressão de 11 miRNAs, em 30 indivíduos saudáveis, após consumo de 30 gramas de nozes por dia, durante 8 semanas, sendo sete regulados positivamente (miR-192, miR-486, miR-19b, miR-106a, miR-130b, miR-18a e miR-769) e quatro regulados negativamente (miR-328, miR-330, miR-221 e miR-125a) (ORTEGA et al., 2015).

Ademais, foram observadas associações positiva do consumo de “Leites e iogurtes” com a expressão plasmática do miR-150 e negativa com a expressão do miR-375. Um estudo de coorte recente de adultos saudáveis indicou que a ingestão de vitamina D como principal nutriente em produtos lácteos estava negativamente associada à expressão de miR-1277 e miR-144-3p (FERRERO et al., 2021). Além disso, após a suplementação com vitamina D, a expressão de 136 miRNAs foi alterada e uma correlação positiva foi encontrada entre a concentração sérica de vitamina D e miR-532-3p e miR-342-5p (JORDE et al., 2012). Além disso, um estudo cruzado randomizado demonstrou que, após a ingestão de diferentes quantidades (0,25, 0,5, 1 L) de leite, a expressão do miR-29b foi regulada positivamente (BAIER et al., 2014). Além da vitamina D, observou-se também que a regulação dos miRNAs pode alterar pela ingestão de nutrientes presentes em laticínios, como cálcio, proteína do soro de leite e a caseína (KHORRAMINEZHAD; RUDKOWSKA, 2022).

No que diz respeito aos grupos alimentares de risco, o consumo de carnes vermelhas se associou positivamente com a expressão plasmática do miR-126, miR-150, miR-223 e miR-376a. Por outro lado, o consumo de carnes processadas se associou negativamente somente a um miRNA (miR-139). A ingestão de ácidos graxos saturados tem sido associada a uma resposta hipertrigliceridêmica pós-prandial maior e mais longa (ORTEGA et al., 2012) e ao aumento do risco de várias doenças crônicas, como doenças cardiovasculares e câncer (HAMMAD; PU; JONES, 2016; ZOBEL et al., 2016). Além disso, a elevada ingestão de ácidos graxos saturados, amplamente presentes na carne vermelha, estimula a resposta inflamatória em adipócitos, macrófagos, células beta e outros tecidos metabólicos, culminando na expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-6 e IL-1 β , sendo que este processo é modulado por miRNAs (QUINTANILHA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017; WONG *et al.*, 2009).

Um estudo que avaliou a expressão de diferentes miRNAs em células mononucleares do sangue periférico, de nove homens, após o consumo imediato de uma refeição rica em

gordura saturada, mostrou diferente padrão de expressão dos miRNAs em jejum e após o consumo da refeição (LOPEZ et al., 2018). Os autores encontraram nove miRNAs *downregulated* (miR-613, miR-629-3p, miR-24-2-5p, miR-555, miR-148a-5p, miR-621, miR-875-3p, miR-513c-5p, e miR-1226), e 10 miRNAs *upregulated* (miR-653, miR-19b-1-5p, miR-363-5p, miR-885-3p, miR-339-3p, miR-938, miR-148b-5p, miR-593-5p, miR-24-2-5p, e miR-200b-5p) no estado pós-prandial, quando comparado ao estado de jejum (LOPEZ et al., 2018).

Ainda no contexto dos grupos alimentares de risco, o consumo de bebidas açucaradas se associou positivamente à expressão plasmática do miR-140. A elevada ingestão de frutose proveniente de refrigerantes e doces tem um impacto negativo na saúde humana (HANOUSKOVÁ et al., 2019). Hanousková *et al.* (2019) avaliaram a expressão de miRNAs no plasma, fígado, tecido adiposo branco, marrom e subcutâneo em camundongos magros e camundongos com obesidade induzida por ração com alto teor de lipídios. Em cada grupo, foi administrada uma bebida rica em frutose. Os autores observaram que a elevada ingestão de frutose regulou positivamente o miR-27 hepático, negativamente o miR-33a no tecido adiposo branco e positivamente o miR-21 no plasma. Além disso, a elevada ingestão de frutose acarretou aumento da expressão de vários miRNAs que participam do metabolismo lipídico, da diferenciação de adipócitos e do desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (HANOUSKOVÁ et al., 2019).

O presente trabalho tem vários pontos fortes e limitações. Entre os pontos fortes, este é o primeiro trabalho a mostrar associações entre a expressão plasmática de 21 miRNAs e o consumo de diversos componentes alimentares, tanto de risco como de proteção contra desfechos de saúde associados ao risco cardiometabólico em uma população representativa brasileira. Ademais, pode-se citar ainda o fato de a amostra avaliada ter sido obtida a partir de um estudo de base populacional, sendo representativa da população do município de São Paulo, maior cidade do Brasil, permitindo a visualização de um cenário mais amplo a partir de evidências robustas, uma vez que o peso amostral foi considerado para todas as análises. Ainda, a avaliação da expressão plasmática de 21 miRNAs no contexto das DCNT é considerada um dos diferenciais deste estudo, uma vez que estudos brasileiros neste contexto ainda são escassos na literatura.

Em termos de limitações, esta investigação se baseia num conjunto de dados transversais, não sendo possível, dessa forma, inferir uma relação causal. Além disso, análises diretas de predição de genes-alvos para cada miRNA não puderam ser realizadas, e, dessa forma, optou-se pelo uso de uma ferramenta de bioinformática para prever os principais genes-alvo de cada miRNA.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que a SM pode alterar a expressão de miRNAs circulantes em idosos. Considerando que dois miRNAs (miR-30 e miR-122) foram alterados pela presença de SM, constata-se que esses miRNAs podem ser considerados potenciais biomarcadores para SM em idosos.

Além disso, idosos com diagnóstico de SM apresentaram maiores concentrações de leptina e maiores valores no SIS, sugerindo resistência periférica à leptina, que está intimamente associada à ocorrência de inflamação sistêmica, crônica e de baixo grau. Além disso, a expressão plasmática de seis miRNAs (miR-15a, miR-16, miR-21, miR-223, miR-363 e miR-532) foi associada aos valores de leptina e SIS, sugerindo um papel potencial destes miRNAs como biomarcadores do risco cardiometabólico em idosos.

Por fim, o consumo de componentes alimentares como “Frutas”, “Hortaliças”, “Cereais integrais” e “Leites e iogurtes” também mostrou interações com a expressão de miRNAs, sendo que o consumo desses grupos alimentares se associou à redução da expressão de diferentes miRNAs. Por outro lado, o consumo de “Carnes vermelhas”, “Carnes processadas” e de “Bebidas açucaradas” se associou ao aumento da expressão de miRNAs. Os resultados obtidos confirmam o papel da dieta na modulação da expressão de miRNAs.

Em suma, o aumento da expressão plasmática de três miRNAs (miR-21, miR-30a e miR-122) sugere maior risco cardiometabólico, ao passo que a redução na expressão plasmática de cinco miRNAs (miR-15a, miR-16, miR-223, miR-363 e miR-532) sugere menor risco cardiometabólico em idosos. Ainda, os resultados encontrados enfatizam a importância da adoção de hábitos alimentares saudáveis na regulação da expressão dos miRNAs e, conseqüentemente, na redução do risco de desenvolvimento de DCNT.

REFERÊNCIAS

- ABDELLATIF, M; ROOIJ, E. V. Differential Expression of MicroRNAs in Different Disease States. **Circulation Research**, v. 110, n. 4, 2012.
- ABETE, I.; ROMAGUERA, D.; VIEIRA, A. R.; LOPEZ DE MUNAIN, A.; NORAT, T. Association between total, processed, red and white meat consumption and all-cause, CVD and IHD mortality: a meta-analysis of cohort studies. **The British Journal of Nutrition**, v. 112, n. 5, p. 762-75, Set. 2014.
- ALDER, H.; TACCIOLI, C.; CHEN, H.; JIANG, Y.; SMALLEY, K. J.; FADDA, P.; OZER, H. G.; HUEBNER, K.; FARBER, J. L.; CROCE, C. M. Dysregulation of miR-31 and miR-21 induced by zinc deficiency promotes esophageal cancer. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 9, p. 1736-1744, 2012.
- ALEHAGEN, U.; JOHANSSON, P.; AASETH, J.; ALEXANDER, J.; WÅGSÄTER, D. Significant changes in circulating microRNA by dietary supplementation of selenium and coenzyme Q10 in healthy elderly males. A subgroup analysis of a prospective randomized double-blind placebo-controlled trial among elderly Swedish citizens. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, Abr. 2017.
- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350-355, 2004.
- ARMANIOS, M.; ALDER, J.K.; PARRY, E.M.; KARIM, B.; STRONG, M.A.; GREIDER, C.W. Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging. **American Journal of Human Genetics**, v. 85, n. 6, p. 823-832, 2009.
- ARROYO, J. D.; CHEVILLET, J. R.; KROH, E. M.; RUF, I. K.; PRITCHARD, C. C.; GIBSON, D. F.; MITCHELL, P. S. et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 108, p. 5003-5008, 2011.
- AWAN, Z.; GENEST, J. Inflammation modulation and cardiovascular disease prevention. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 22, n. 6, p. 719-33, Jun. 2015.
- BAIER, S. R.; NGUYEN, C.; XIE, F.; WOOD, J. R.; ZEMPLIENI, J. MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and mouse livers. **The Journal of Nutrition**, v. 144, n. 10, p. 1495-500, Out. 2014.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-97, Jan. 2004.
- BARZILAI, N.; HUFFMAN, D. M.; MUZUMDAR, R. H.; BARTKE, A. The critical role of metabolic pathways in aging. **Diabetes**, v. 61, n. 6, p. 1315-22, Jun. 2012.
- BAYRAKTAR, R.; VAN ROOSBROECK, K.; CALIN, G. A. Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones. **Molecular Oncology**, [S. l.], v. 11, n. 12, p. 1673-1686, 2017.

BIOLO, G.; CEDERHOLM, T.; MUSCARITOLI, M. Muscle contractile and metabolic dysfunction is a common feature of sarcopenia of aging and chronic diseases: from sarcopenic obesity to cachexia. **Clinical Nutrition**, v. 33, 737-748, 2014.

BJORKMAN, M.; JYVAKORPI, S. K.; STRANDBERG, T. E.; PITKALA, K. H.; TILVIS, R. S. Sarcopenia indicators as predictors of functional decline and need for care among older people. **The Journal of Nutrition, Health & Aging**, v. 23, p. 916-922, 2019.

BLACKBURN, E. H.; GREIDER, C. W.; SZOSTAK, J. W. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. **Nature Medicine**, v. 12, n. 10, p. 1133-1138, 2006.

BLEYS, J.; NAVAS-ACIEN, A.; GUALLAR, E. Serum selenium levels and all-cause, cancer, and cardiovascular mortality among US adults. **Arch. Intern. Med.**, v. 168, n. 4, p. 404-410, 2008.

BODNAR, A.G.; OUELLETTE, M.; FROLKIS, M.; HOLT, S. E.; CHIU, C. P.; MORIN, G. B.; HARLEY, C. B.; et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. **Science**, v. 16;279, n. 5649, p. 349-352, 1998.

BOKOV, A.; CHAUDHURI, A.; RICHARDSON, A. The role of oxidative damage and stress in aging. **Mechanisms of Ageing Development**, v. 125, n. 10-11, p. 811–826, Out.-Nov. 2004.

BOONEKAMP, J. J.; SIMONS, M. J.; HEMERIK, L.; VERHULST, S. Telomere length behaves as biomarker of somatic redundancy rather than biological age. **Ageing Cell**, v. 12, n. 2, p. 330-332, 2013.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Tábua completa de mortalidade para o Brasil – 2019. Breve análise da evolução da mortalidade no Brasil.** 2020a.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)/Diretoria de Pesquisas. Coordenação de População e Indicadores Sociais. Gerência de Estudos e Análises da Dinâmica Demográfica. **Projeção da população do Brasil por sexo e idade para o período 2010-2060.** 2020b.

BRASIL, Ministério da Saúde. (2011). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. **Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022** / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Brasília (DF), 2011a.

BRASIL. Resolução do Conselho Nacional de Saúde n. 441, 12 de maio de 2011. **Armazenamento e à utilização de material biológico humano com finalidade de pesquisa**, Brasília, DF, maio 2011b.

BRASIL. Resolução do Conselho Nacional de Saúde n. 446, 12 de dez. de 2012. **Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos**, Brasília, DF, dez 2012.

CAMPOS-PEREZ, W.; MARTINEZ-LOPEZ, E. Effects of short chain fatty acids on metabolic and inflammatory processes in human health. **BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1866, n. 5, 158900, 2021.

CARVALHO, G. B.; BRANDÃO-LIMA, P. N.; PAYOLLA, T. B.; LUCENA, S. E. F.; SARTI, F. M.; FISBERG, R. M.; ROGERO, M. M. Circulating MiRNAs Are Associated With Low-grade Systemic Inflammation and Leptin Levels in Older Adults. **Inflammation**, v. 19, Jul. 2023a.

CARVALHO, G. B.; PAYOLLA, T. B.; BRANDÃO-LIMA, P. N.; SARTI, F. M.; FISBERG, R. M.; ROGERO, M. M. Association between circulating micro-ribonucleic acids and metabolic syndrome in older adults from a population-based study. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 58, p. 320-5, Dez. 2023b.

CASABIELL, X.; PINIERO, V.; PEINO, R.; LAGE, M.; CAMIÑA, J.; GALLEGO, R.; VALLEJO, L. G.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F. F. Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: Dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, n. 6, p. 2149-55, Jun. 1998.

CESAR, C. L. G., et al. **Saúde e condição de vida em São Paulo: inquérito multicêntrico de saúde no Estado de São Paulo; ISA-SP**. [São Paulo]: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Acesso em: 13 abr. 2021, 2005.

CHAKRABORTY, C.; DOSS, C. G. P.; BANDYOPADHYAY, S.; AGORAMOORTHY, G. Influence of miRNA in insulin signaling pathway and insulin resistance: Micro-molecules with a major role in type-2 diabetes. **Wiley Interdisciplinary Reviews**. 2014.

CHAN, C. B.; DE LEO, D.; JOSEPH, J. W.; MCQUAID, T. S.; HA, X. F.; XU, F.; TSUSHIMA, R. G.; PENNEFATHER, P. S.; SALAPATEK, A. M.; WHEELER, M. B. Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: Mechanism of action. **Diabetes**, v. 50, n. 6, p. 1302-10, Jun. 2001.

CHEN, L.; CHEN, R.; WANG, H.; LIANG, F. Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. **International Journal of Endocrinology**, Jun. 2015.

CHEN, L.; CUI, J.; HOU, J.; LONG, J.; LI, C.; LIU, L. A novel negative regulator of adipogenesis: MicroRNA-363. **Stem Cells**. 2014.

CHEN, X; LIANG, H.; ZHANG, J.; ZEN, K.; ZHANG, C. Y. Secreted microRNAs: A new form of intercellular communication. **Trends in Cell Biology**, v. 22, n. 3, p. 125-132, 2012.

COLLADO, M.; BLASCO, M. A.; SERRANO, M. Cellular senescence in cancer and aging. **Cell**, v. 27;130, n. 2, p. 223-233, 2007.

COPPS, K. D.; WHITE, M. F. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. **Diabetologia**, v. 55, n. 10, p. 2565-2582. Ago. 2012.

CRUZ, K. J. C. et al. Role of microRNAs on adipogenesis , chronic low-grade inflammation, and insulin resistance in obesity. **Nutrition**, v. 35, p. 28–35, 2017.

CUI, J. et al. Nutrition, microRNAs, and Human Health. **Advances in Nutrition**, v. 8, p. 105–112, 2017.

DA COSTA MARTINS, P. A.; SALIC, K.; GLADKA, M. M.; ARMAND, A. S.; LEPTIDIS, S.; EL AZZOUZI, H.; HANSEN, A.; COENEN-DE ROO, C. J.; BIERHUIZEN, M. F.; VAN DER NAGEL, R.; et al. MicroRNA-199b targets the nuclear kinase Dyrk1a in an auto-amplification loop promoting calcineurin/NFAT signalling. **Nature Cell Biology**, v. 12, 1220-7, Dez. 2010.

DALI-YOUCEF N, MECILI M, RICCI R, ANDRÈS E. Metabolic inflammation: Connecting obesity and insulin resistance. **Annals of Medicine**, v. 45, n. 3, p. 242-53, Mai. 2013.

DAMBAL, S.; GIANGRECO, A. A.; ACOSTA, A. M.; FAIRCHILD, A.; RICHARDS, Z.; DEATON, R.; WAGNER, D.; VIETH, R.; GANN, P. H.; KAJDACSZY-BALLA, A.; et al. microRNAs and DICER1 are regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D in prostate stroma. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 167, p. 192-202, Mar. 2017.

DONGHUI T, SHUANG B, XULONG L; MENG, Y.; YUJING, G.; YUJIE, H.; JUAN, L.; DONGSHENG, Y. Improvement of microvascular endothelial dysfunction induced by exercise and diet is associated with microRNA-126 in obese adolescents. **Microvascular Research**, v. 123, p. 86-91, Mai. 2019.

DUNCAN, B. B.; CHOR, D.; AQUINO, E. M. L.; BENSENOR, I. M.; MILL, J. G.; SCHMIDT, M. I.; LOTUFO, P. A.; et al. Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, 2012.

EBRAHIMI, R.; BAHIRAEI, A.; NIAZPOUR, F.; EMAMGHOLIPOUR, S.; MESHKANI, R. The role of microRNAs in the regulation of insulin signaling pathway with respect to metabolic and mitogenic cascades: A review. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 12, p. 19290-309, Dez. 2019.

EDGAR, D.; SHABALINA, I.; CAMARA, Y.; WREDENBERG, A.; CALVARUSO, M.A.; NIJTMANS, L.; NEDERGAARD, J.; et al. Random point mutations with major effects on protein-coding genes are the driving force behind premature aging in mtDNA mutator mice. **Cell Metabolism**, v. 10, n. 2, p. 131-138, 2009.

ESAU, C.; DAVIS, S.; MURRAY, S. F.; YU, X. X.; PANDEY, S. K.; PEAR, M.; WATTS, L.; BOOTEN, S. L.; GRAHAM, M.; MCKAY, R.; SUBRAMANIAM, A.; PROPP, S.; LOLLO, B. A.; FREIER, S.; BENNETT, C. F.; BHANOT, S.; MONIA, B. P. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. **Cell Metabolism**, 3, n. 2, p. 87-98, Fev. 2006.

FABBRI, M. MicroRNAs and miReceptors: a new mechanism of action for intercellular

communication. **Philosophical Transactions Real Society B**, v. 373, 2017.

FERRERO, G.; CARPI, S.; POLINI, B.; PARDINI, B.; NIERI, P.; IMPEDUGLIA, A.; GRIONI, S.; TARALLO, S.; NACCARATI, A. Intake of natural compounds and circulating microRNA expression levels: their relationship investigated in healthy subjects with different dietary habits. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, Jan. 2021.

FISBERG, R. M.; LEME, A. C. B.; PREVIDELLI, Á.; MELLO, A. V.; MARTINEZ, A. G.; SALES, C. H.; GÓMEZ, G.; KOVALSKYS, I.; HERRERA-CUENCA, M.; SANABRIA, L. Y. C.; GARCÍA, M. C. Y.; TORRES, T. G.; RIGOTTI, A.; FISBERG, M.; ELANS Study Group. Contribution of food groups to energy, total gram amount and nutrients-to-limit: the Latin American study of nutrition and health/Estudio Latino Americano de Nutrición y Salud (ELANS). **Public Health Nutrition**, v. 24, n. 9, p. 2424-36, Jun. 2021.

FISBERG, R. M.; MARCHIONI, D. M. L. **Manual de Avaliação do Consumo Alimentar em Estudos Populacionais: A Experiência do Inquérito de Saúde em São Paulo (ISA)**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2012.

FISBERG, R. M.; SALES, C. H.; FONTANELLI, M. M.; PEREIRA, J. L.; ALVES, M. C. G. P.; ESCUDER, M. M. L.; CÉSAR, C. L. G.; GOLDBAUM, M. 2015 Health Survey of São Paulo with Focus in Nutrition: Rationale, Design, and Procedures. **Nutrients**, v. 10, n. 2, p. 169, Feb. 2018.

FISBERG, R. M.; SLATER VILLAR, B.; COLUCCI, A. C. A.; PHILIPPI, S.T. Alimentação equilibrada na promoção da saúde. In: **Nutrição clínica no adulto**. São Paulo: Manole, 2002. p. 47–54.

FLINT, H. J.; SCOTT, K. P.; DUNCAN, S. H.; LOUIS, P.; FORANO, E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. **Gut Microbes**, v. 3, n. 4, p. 289-306, 2012.

FLORES, I.; CAYUELA, M. L.; BLASCO, M. A. Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. **Science**, v. 19;309, n. 5738, p. 1253-1256, 2005.

FLORES-MATEO, G.; NAVAS-ACIEN, A.; PASTOR-BARRIUSO, R.; GUALLAR, E. Selenium and coronary heart disease: A meta-analysis. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 84, n. 4, p. 762-773, 2006.

FLOWERS, E.; WON, G. Y.; FUKUOKA, Y. MicroRNAs associated with exercise and diet: a systematic review. **Physiol Genomics**, v. 47, p. 1-11, 2015.

FONTANA, L.; PARTRIDGE, L.; LONGO, V. D. Extending healthy life span--from yeast to humans. **Science**, v. 328, n. 5976, p. 321-6, Abr. 2010.

FRAGA, M. F.; ESTELLER, M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. **Trends in Genetics**, v. 23, n. 8, p. 413-418, 2007.

FRANCESCHI, C.; GARAGNANI, P.; PARINI, P.; GIULIANI, C.; SANTORO, A. Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. **Nature Reviews**, v. 14, n. 10, p. 576-590, 2018.

- FUMAGALLI, M.; ROSSIELLO, F.; CLERICI, M.; BAROZZI, S.; CITTARO, D.; KAPLUNOV, J. M.; BUCCI, G.; et al. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. **Nature Cell Biology**, v. 18;14, n. 4, p. 355-365, 2012.
- FURUYAMA, T.; KITAYAMA, K.; YAMASHITA, H.; MORI, N. Forkhead transcription factor FOXO1 (FKHR)-dependent induction of PDK4 gene expression in skeletal muscle during energy deprivation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 375, p. 365-71, Oct. 2003.
- GAEDICKE, S.; ZHANG, X.; SCHMELZER, C.; LOU, Y.; DOERING, F.; FRANK, J.; RIMBACH, G. Vitamin E dependent microRNA regulation in rat liver. **FEBS Letters**, v. 582, n. 23-24, p. 3542-6, Oct. 2008.
- GAVRILAS, L. I.; IONESCU, C.; TUDORAN, O.; LISENCU, C.; BALACESCU, O.; MIERE, D. The role of bioactive dietary components in modulating miRNA expression in colorectal cancer. **Nutrients**, v. 8, n. 10, p. 590, 2016.
- GELONEZE, B.; VASQUES, A.C. J.; STABE, C.F.C; PAREJA, J C; ROSADO, L. E. F. P. de L.; QUEIROZ, E. C. De; TAMBASCIA, M. A. 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. 281–287, 2009.
- GEMS, D.; PARTRIDGE, L. Genetics of longevity in model organisms: debates and paradigm shifts. **Annual Review of Physiology**, v. 75, p. 621-644, 2013.
- GHORBANI, S.; MAHDAVI, R.; ALIPOOR, B.; PANAH, G.; ESFAHANI, E. N.; RAZI, F.; TAGHIKHANI, M.; et al. Decreased serum microRNA-21 level is associated with obesity in healthy and type 2 diabetic subjects. **The Journal of Metabolic Diseases**, v. 124, n. 4, p. 300-305, 2018.
- GREEN, D. R.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. **Science**, v. 26;333, n. 6046, p. 1109-1112, 2011.
- GUENTHER, P. M.; DEMAIO, T. J.; INGWERSEN, L. A.; BERLIN, M. The multiple-pass approach for the 24-hour recall in the continuing survey of food intakes by individuals 1994-96. **The FASEB Journal**, v. 10, n. 198, 1996.
- GUGLIELMI, V.; D'ADAMO, M.; MENGHINI, R.; CARDELLINI, M.; GENTILESCHI, P.; FEDERICI, M.; SBRACCIA, P. MicroRNA 21 is up-regulated in adipose tissue of obese diabetic subjects. **Nutr Healthy Aging**. 2017.
- HAMER, H. M.; JONKERS, D.; VENEMA, K.; VANHOUTVIN, S.; TROOST, F. J.; BRUMMER, R. J. Review article: the role of butyrate on colonic function. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 104-119, 2008.
- HAN, S.; BRUNET, A. Histone methylation makes its mark on longevity. **Trends in Cell Biology**, v. 22, n. 1, p. 42-49, 2012.

HANOUSKOVÁ, B.; NEPRAŠOVÁ, B.; SKÁLOVÁ, L.; MALETÍNSKÁ, L.; ZEMANOVÁ, K.; AMBROŽ, M.; MATOUŠKOVÁ, P. High-fructose drinks affect microRNAs expression differently in lean and obese mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 68, p. 42-50, Jun. 2019.

HARMAN, D. The free radical theory of aging: effect of age on serum copper levels. **Journal of Gerontology**, v. 20, p. 151-153, 1965.

HARTL, F. U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v. 475, p. 324-332, 2011.

HE, N.; ZHANG, L. Y.; ZHANG, Y.; FENG, B.; ZHENG, Z.; WANG, D.; ZHANG, S. et al. Circulating MicroRNAs in Plasma Decrease in Response to Sarcopenia in the Elderly. **Frontiers in Genetics**, v. 11, 2020.

HELLSTRÖM, L.; WAHRENBERG, H.; HRUSKA, K.; REYNISDOTTIR, S.; ARNER, P. Mechanisms behind gender differences in circulating leptin levels. **Journal of Internal Medicine**, v. 247, n. 4, p. 457-62, Abr. 2000.

HENEGHAN, H. M.; MILLER, N.; KERIN, M. J. Role of microRNAs in obesity and the metabolic syndrome. **Obes Rev**, v. 11, n. 5, p. 354-361, 2010.

HENNINGSSON, Å. M.; BJORCK, I. M. E.; NYMAN, E. M. G. L. Combinations of indigestible carbohydrates affect short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 10, p. 3098-3104, 2002.

HEWITT, G.; JURK, D.; MARQUES, F. D.; CORREIA-MELO, C.; HARDY, T.; GACKOWSKA, A.; ANDERSON, R.; et al. Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. **Nature Communications**, v. 3, n. 708, 2012.

HEYN, G.S.; CORRÊA, L. H.; MAGALHÃES, K. G. The Impact of Adipose Tissue-Derived miRNAs in Metabolic Syndrome, Obesity, and Cancer. **Frontiers in Endocrinology**. 2020.

HIJMANS, J. G.; DIEHL, K. J.; BAMMERT, T. D.; KAVLICH, P. J.; LINCENBERG, G. M.; GREINER, J. J.; STAUFFER, B. L.; DESOUSA, C. A. Association between hypertension and circulating vascular-related microRNAs. **Journal of Human Hypertension**, v. 32, n. 6, p. 440-447, 2018.

HIONA, A.; SANZ, A.; KUJOTH, G.C.; PAMPLONA, R.; SEO, A.Y.; HOFER, T.; SOMEYA, S.; et al. Mitochondrial DNA mutations induce mitochondrial dysfunction, apoptosis and sarcopenia in skeletal muscle of mitochondrial DNA mutator mice. **PLoS One**, v. 7;5, n. 7, e11468, 2010.

HOEIJMAKERS, J. H. DNA damage, aging, and cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 15, p. 1475-1485, 2009.

HOOTEN, N. N.; FITZPATRICK, M.; WOOD, W. H.; DE, S.; EJIUGU, N.; ZHANG, Y.; MATTISON, J. A.; et al. Age-related changes in microRNA levels in serum. **Ageing (Albany NY)**, v. 5, n. 10, p. 725-740, 2013.

HU, S.; DONG, T. S.; DALAL, S. R.; WU, F.; BISSONNETTE, M.; KWON, J. H.; CHANG, E. B. The Microbe-Derived Short Chain Fatty Acid Butyrate Targets miRNA-Dependent p21 Gene Expression in Human Colon Cancer. **PLoS One**, v. 6, n. 1, Jan. 2011.

HULSMANS, M.; KEYZER, D.; HOLVOET, P. MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis. **FASEB J**, v. 25, n. 8, p. 2515-2527, 2011.

IACOMINO, G.; SIANI, A. Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. **Genes & Nutrition**. 2017.

IFTIKHAR, H.; CARNEY, G. E. Evidence and potential in vivo functions for biofluid miRNAs: From expression profiling to functional testing: Potential roles of extracellular miRNAs as indicators of physiological change and as agents of intercellular information exchange. **BioEssays**, v. 38, n. 4, p. 367–378, 2016. a.

IFTIKHAR, H.; CARNEY, G. E. Evidence and potential in vivo functions for biofluid miRNAs: From expression profiling to functional testing. **Bioessays**, v. 38, p. 367-378, 2016. b.

IMPROTA-CARIA, A.C.; SOUSA, R. A. L.; ROEVER, L.; FERNANDES, T.; OLIVEIRA, E. M.; ARAS JÚNIOR, R.; SOUZA, R. S. F. Micro-RNAs in type 2 diabetes mellitus: potential role of physical exercise. **Reviews in Cardiovascular Medicine**, v. 23, n. 1, Jan. 2022.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome**. International Diabetes Federation (online). 2006. Disponível em: <<https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definition-of-the-metabolic-syndrome.html>>.

JANZEN, V.; FORKERT, R.; FLEMING, H.E.; SAITO, Y.; WARING, M. T.; DOMBKOWSKI, D. M.; CHENG, T.; et al. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. **Nature**, v. 28;443, n. 7110, p. 421-426, 2006.

JAYAPRAKASAM, B.; VAREED, S. K.; OLSON, L. K.; NAIR, M. G. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 28-31, Jan. 2005.

JEONG KIM, Y.; JIN HWANG, S.; CHAN BAE, Y.; SUP JUNG, J. MiR-21 regulates adipogenic differentiation through the modulation of TGF- β signaling in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. **Stem Cells**, v. 27, n. 12, p. 3093-102, Dez. 2009.

JORDE, R.; SVARTBERG, J.; JOAKIMSEN, R. M.; COUCHERON, D. H. Plasma profile of microRNA after supplementation with high doses of vitamin D3 for 12 months. **BMC Research Notes**, v. 5, p. 245-8, Mai. 2012.

KAJIMURA, S.; SAITO, M. A New Era in Brown Adipose Tissue Biology: Molecular Control of Brown Fat Development and Energy Homeostasis. **Annu Rev Physiol**, v. 76, p. 225-249, 2014.

- KARKENI, E.; BONNET, L.; MARCOTORCHINO, J.; TOURNIAIRE, F.; ASTIER, J.; YE, J.; LANDRIER, J. F. Vitamin D limits inflammation-linked microRNA expression in adipocytes in vitro and in vivo: A new mechanism for the regulation of inflammation by vitamin D. **Epigenetics**, v. 13, n. 2, p. 156-62, Mar. 2018.
- KELLER, P.; GBURCIK, V.; PETROVIC, N.; GALLAGHER, I. J.; NEDERGAARD, J.; CANNON, B.; TIMMONS, J. A. Gene-chip studies of adipogenesis-regulated microRNAs in mouse primary adipocytes and human obesity. **BMC Endocrine Disorders**. 2011.
- KENYON, C. J. The genetics of ageing. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 504-12, Mar. 2010.
- KIRSCHNER, M.B.; EDELMAN, J. James B.; KAO, Steven C. H.; VALLELY, M.P.; VAN ZANDWIJK, N.; REID, G. The impact of hemolysis on cell-free microRNA biomarkers. **Frontiers in Genetics**, v. 4, p. 1–13, 2013.
- KOGA, H.; KAUSHIK, S.; CUERVO, A. M. Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. **Ageing Research Reviews**, v. 10, n. 2, p. 205-215, 2011.
- KOH, E. H.; CHEN, Y.; BADER, D. A.; HAMILTON, M. P.; HE, B.; YORK, B.; KAJIMURA, S.; MCGUIRE, S. E.; HARTIG, S. M. Mitochondrial Activity in Human White Adipocytes Is Regulated by the Ubiquitin Carrier Protein 9/microRNA-30a Axis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 47, p. 24747-55, Out. 2016.
- KHORRAMINEZHADA, L.; RUDKOWSKAB, I. Dairy Product Intake Modifies MicroRNA Expression among Individuals with Hyperinsulinemia: A Post-Intervention Cross-Sectional Study. **Lifestyle Genomics**, v. 15, n. 3, p. 77-86, Fev. 2022.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, 99-163, 2007.
- KRONSKI, E.; FIORI, M. E.; BARBIERI, O.; ASTIGIANO, S.; MIRISOLA, V.; KILLIAN, P. H.; BRUNO, A.; PAGANI, A.; ROVERA, F.; PFEFFER, U.; et al. miR181b is induced by the chemopreventive polyphenol curcumin and inhibits breast cancer metastasis via down-regulation of the inflammatory cytokines CXCL1 and -2. **Mol. Oncol.**, v. 8, n. 3, p. 581-595, 2014.
- KUMAR, R.; MAL, K.; RAZAQ, M. K.; MAGSI, M.; MEMON, M. K.; MEMON, S.; AFROZ, M. N.; SIDDIQUI, H. F.; RIZWAN, A. Association of Leptin With Obesity and Insulin Resistance. **Cureus**, v. 12, n. 12, Dez. 2020.
- KURA, B.; BABAL, P.; SLEZAK, J. Implication of microRNAs in the development and potential treatment of radiation-induced heart disease. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 95, n. 10, p. 1236-44, Out. 2017.
- KURA, B.; PARIKH, M.; SLEZAK, J.; PIERCE, G. N. The Influence of Diet on MicroRNAs that Impact Cardiovascular Disease. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1509, Abr. 2019.
- LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, v. 13;149, n. 2, p. 274-293, 2012.

LEE, D.E.; BROWN, J. L.; ROSA, M. E.; BROWN, L. A.; PERRY JR., R. A.; WIGGS, M. P.; NILSSON, M. I.; CROUSE, S. F.; FLUCKEY, J. D.; WASHINGTON, T. A.; GREENE, N. P. microRNA-16 Is Downregulated During Insulin Resistance and Controls Skeletal Muscle Protein Accretion. **Journal of Cellular Biochemistry**. 2016.

LEE, M. J.; WU, Y.; FRIED, S. K. Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 1, p. 1-11, 2013.

LEÓN-PEDROZA, J. I.; GONZÁLEZ-TAPIA, L. A.; DEL OLMO-GIL, E.; CASTELLANOS-RODRÍGUEZ, D.; ESCOBEDO, G.; GONZÁLEZ-CHÁVEZ, A. Low-grade systemic inflammation and the development of metabolic diseases: From the molecular evidence to the clinical practice. *Cirugia y Cirujanos*. 2014

LHAMYANI, S.; GENTILE, A. M.; GIRÁLDEZ-PÉREZ, R. M.; FEIJÓO-CUARESMA, M.; ROMERO-ZERBO, S. Y.; CLEMENTE-POSTIGO, M.; ZAYED, H.; OLIVERA, W. O.; BERMÚDEZ-SILVA, F. J.; SALAS, J.; GÓMEZ, C. L.; HAJJI, N.; FUSTER, G. O.; TINAHONES, F. J.; EL BEKAY, R. miR-21 mimic blocks obesity in mice: a novel therapeutic option. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 26, p. 401-16, Jul. 2020.

LI, Y.; YANG, N.; DONG, B.; YANG, J.; KOU, L.; QIN, Q. MicroRNA-122 promotes endothelial cell apoptosis by targeting XIAP: Therapeutic implication for atherosclerosis. **Life Sciences**, v. 232, Set 2019.

LING, H. Y.; OU, H. S.; FENG, S. D.; ZHANG, X. Y.; TUO, Q. H.; CHEN, L. X.; et al. Changes in microRNA (miR) profile and effects of mir-320 in insulin-resistant 3t3-11 adipocytes. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 36, n. 9, 2009.

LINHART, H. G.; ISHIMURA-OKA, K.; DEMAYO, F.; KIBE, T.; REPKA, D.; POINDEXTER, B.; BICK, R. J.; DARLINGTON, G. J. C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. **The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2001.

LOPEZ, S.; BERMUDEZ, B.; DE LA PAZ, S. M.; ABIA, R.; MURIANA, F. J. G. A microRNA expression signature of the postprandial state in response to a high-saturated-fat challenge. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 57, p. 45-55, Jul. 2018.

LÓPEZ-JARAMILLO, P.; GÓMEZ-ARBELÁEZ, D.; LÓPEZ-LÓPEZ, J.; LÓPEZ-LÓPEZ, C.; MARTÍNEZ-ORTEGA, J.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, A.; TRIANA-CUBILLOS, S. The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 18, n. 1, p. 37-45, Abr. 2014.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M.; KROEMER, G. The Hallmarks of Aging. **Cell**, v. 153, n. 6, 2013.

MA, X.; BUSCAGLIA, L. E. B.; BARKER, J. R.; LI, Y. MicroRNAs in NF- κ B signaling. **J Mol Cell Biol**, v. 3, n. 3, p. 159-166, 2011.

MA, E.; FU, Y.; GARVEY, T. Relationship of Circulating miRNAs with Insulin Sensitivity and Associated Metabolic Risk Factors in Humans. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 16, n. 1, p. 82-9, Mar. 2018.

- MACIEL-DOMINGUEZ, A.; SWAN, D.; FORD, D.; HESKETH, J. Selenium alters miRNA profile in an intestinal cell line: Evidence that miR-185 regulates expression of GPX2 and SEPSH2. *Mol. Nutr. Food Res.*, v. 57, n. 12, p. 2195-2205, 2013.
- MAHDAVI, R.; GHORBANI, S.; ALIPOOR, B.; PANAHI, G.; KHODABANDEHLOO, H.; ESFAHANI, E. N.; RAZI, F.; MESHKANI, R. Decreased Serum Level of miR-155 is Associated with Obesity and its Related Metabolic Traits. *Clinical Laboratory*, v. 64, n. 1, p. 77-84, Jan. 2018.
- MAZUSAKI, H.; OGAWA, Y.; ISSE, N.; SATOH, N.; OKAZAKI, T.; SHIGEMOTO, M.; MORI, K.; TAMURA, N.; HOSODA, K.; YOSHIMASA, Y. Human obese gene expression: Adipocyte specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes*, v. 44, n. 7, p. 855-8, Jul. 1995.
- MELLO, A. V.; SARTI, F. M.; FISBERG, R. M. Associations among diet costs, food prices and income: Elasticities of risk and protection food groups for cardiometabolic diseases in Sao Paulo, Brazil (2003–2015). *Nutrition and Health*, v. 7, Jun. 2022.
- MINISTÉRIO DA SAUDE. **Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional - SISVAN**. 1. ed. Brasília: Série G. Estatística e Informação em Saúde, 2011.
- MIZUSHIMA, N.; LEVINE, B.; CUERVO, A. M.; KLIONSKY, D. J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, v. 18;451, n. 7182, p. 1069-1075, 2008.
- MOLICA, F.; MOREL, S.; KWAK, B. R.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; STEFFENS, S. Adipokines at the crossroad between obesity and cardiovascular disease. *Thromb Haemost*, v. 113, n. 5, p. 553-566, 2015.
- MONTAGUE, C. T.; PRINS, J. B.; SANDERS, L.; ZHANG, J.; SEWTER, C. P.; DIGBY, J.; BYRNE, C. D.; O'RAHILLY, S. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes*, v. 47, n. 9, p. 1384-91, Set.1998.
- MULLINS, A. P.; ARJMANDI, B. H. Health Benefits of Plant-Based Nutrition: Focus on Beans in Cardiometabolic Diseases. *Nutrients*, v. 13, n. 2, p. 519, Fev. 2021.
- MYERS, M.G.; HEYMSFIELD JR, S. B.; HAFT, C.; KAHN, B. B.; LAUGHLIN, M.; LEIBEL, R. L.; TSCHÖP, M. H.; YANOVSKI, J. A. Challenges and opportunities of defining clinical leptin resistance. *Cell Metabolism*, v. 15, n. 2, p. 150-6, Fev. 2012.
- NORDE, M.M.; FISBERG, R. M.; MARCHIONI, D. M. L.; ROGERO, M. M. Systemic low-grade inflammation-associated lifestyle, diet, and genetic factors: A population-based cross-sectional study. *Nutrition*, v. 70., Feb. 2020.
- O'BRIEN, J.; HAYDER, H.; ZAYED, Y.; PENG, C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology*, v. 9, p. 1–12, 2018.

OGER, F.; GHEERAERT, C.; MOGILENKO, D.; BENOMAR, Y.; MOLENDI-COSTE, O.; BOUCHAERT, E.; et al. Cell-specific dysregulation of microRNA expression in obese white adipose tissue. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 99, n. 8, p. 2821-2833, 2014.

OLIVEIRA, A. R. S.; CRUZ, K. J. C.; MORAIS, J. B. S.; SEVERO, J. S.; FREITAS, T. E.; VERAS, A. L.; et al. Magnesium Status and Its Relationship with C-Reactive Protein in Obese Women. **Biol Trace Elem Res**, v. 168, n. 2, p. 296-302, 2015.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **XXXVI Reunión del Comité Asesor de Investigaciones en Salud** – Encuesta Multicêntrica – Salud Bienestar y Envejecimiento (SABE) en América Latina e el Caribe – Informe preliminar. 2002. Disponível em: <<http://www.opas.org/program/sabe.html>>.

ORTEGA, F. J.; CARDONA-ALVARADO, M. I.; MERCADER, J. M.; MORENO-NAVARRETE, J. M.; MORENO, M.; SABATER, M.; FUENTES-BATLLELL, N.; RAMÍREZ-CHÁVEZ, E.; RICART, W.; MOLINA-TORRES, J.; et al. Circulating profiling reveals the effect of a polyunsaturated fatty acid-enriched diet on common microRNAs. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 10, p. 1095-101, Oct. 2015.

ORTEGA, F. J.; MERCADER, J. M.; CATALÁN, V.; MORENO-NAVARRETE, J. M.; PUEYO, N.; SABATER, M.; GÓMEZ-AMBROSI, J.; ANGLADA, R.; FERNÁNDEZ-FORMOSO, J. A.; RICART, W.; FRÜHBECK, G.; FERNÁNDEZ-REAL, J. M. Targeting the Circulating MicroRNA Signature of Obesity. **Clinical Chemistry**. 2013.

ORTEGA, F. J.; MERCADER, J. M.; MORENO-NAVARRETE, J. M.; ROVIRA, O.; GUERRA, E.; ESTEVE, E.; XIFRA, G.; MARTÍNEZ, C.; RICART, W.; RIEUSSET, J.; ROME, S.; KARCZEWSKA-KUPCZEWSKA, M.; STRACZKOWSKI, M.; FERNÁNDEZ-REAL, J. M. Profiling of Circulating MicroRNAs Reveals Common MicroRNAs Linked to Type 2 Diabetes That Change With Insulin Sensitization. **Diabetes Care**, v. 37, n. 5, p. 1375-83, Jan. 2014.

OSELLA, M. et al. Interplay of microRNA and epigenetic regulation in the human regulatory network. **Frontiers in genetics**, v. 5, n. October, p. 1–10, 2014.

OUELLET, V.; LABBÉ, S. M.; BLONDIN, D. P.; PHOENIX, S.; GUÉRIN, B.; HAMAN, F.; et al. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. **J Clin Invest**, v. 122, n. 2, p. 545-552, 2012.

PALM, W.; DE LANGE, T. How shelterin protects mammalian telomeres. **Annual Review of Genetics**, v. 42, p. 301-334, 2008.

PALMER, J. D.; SOULE, B. P.; SIMONE, B. A.; ZAORSKY, N. G.; JIN, L.; SIMONE, N. L. MicroRNA expression altered by diet: Can food be medicinal? **Ageing Research Revs**, v. 17, p. 16-24, Set. 2014.

PASCALE, A.; MARCHESI, N.; MARELLI, C.; COPPOLA, A.; LUZI, L.; GOVONI, S.; et al. Microbiota and metabolic diseases. **Endocrine**, v. 61, p. 357-371, 2018.

PEREIRA, B. L. B.; REIS, P. P.; SEVERINO, F. E.; FELIX, T. F.; BRAZ, M. G.; NOGUEIRA, F. R.; SILVA, R. A. C.; CARDOSO, A. C.; LOURENÇO, M. A. M.;

FIGUEIREDO, A. M.; et al. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) or lycopene supplementation attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction through different mechanistic pathways. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 46, p. 117-24, Ago. 2017.

PESCADOR, N.; PÉREZ-BARBA, M.; IBARRA, J. M.; CORBATÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAD, M. T.; SERRANO-RÍOS, M. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers. **PLoS One**, v. 8, n. 10, 2013.

PIÑEIRO, V.; CASABIELL, X.; PEINÓ, R.; LAGE, M.; CAMIÑA, J. P.; MENENDEZ, C.; BALTAR, J.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F. Dihydrotestosterone, stanozolol, androstenedione and dehydroepiandrosterone sulphate inhibit leptin secretion in female but not in male samples of omental adipose tissue in vitro: Lack of effect of testosterone. **Journal of Endocrinology**, v. 160, n. 3, p. 425-32, Mar. 1999.

POWERS, E.T.; MORIMOTO, R.I.; DILLIN, A.; KELLY, J.W.; BALCH, W.E. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 959-991, 2009.

PRASADI, N.; JOYE, I. J. Dietary Fibre from Whole Grains and Their Benefits on Metabolic Health. **Nutrients**, v. 12, n. 10, p. 3045, Out. 2020.

QIAO, Q.; GROUP, D. S. Comparison of different definitions of the metabolic syndrome in relation to cardiovascular mortality in European men and women. **Diabetologia**, v. 49, n. 12, p. 2837-46, Dez. 2006.

QUINTANILHA, B. J. et al. Nutrimiromics: Role of microRNAs and Nutrition in Modulating Inflammation and Chronic Diseases. **Nutrients**, v. 9, n. 1168, p. 1–24, 2017.

RANDO, T. A.; CHANG, H. Y. Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock. **Cell**, v. 20;148, n. 1-2, p. 46-57, 2012.

RASHEED, Z.; RASHEED, N.; AL-SHAYA, O. Epigallocatechin-3-O-gallate modulates global microRNA expression in interleukin-1 β -stimulated human osteoarthritis chondrocytes: potential role of EGCG on negative co-regulation of microRNA-140-3p and ADAMTS5. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 3, p. 917-28, 2018.

REIS, B. Z.; DUARTE, G. B. S.; VARGAS-MENDEZ, E.; FERREIRA, L. R. P.; BARBOSA, F, JR; CERCATO, C.; ROGERO, M. M.; COZZOLINO, S. M. F. Brazil nut intake increases circulating miR-454-3p and miR-584-5p in obese women. **Nutrition Research**, v. 67, p. 40-52, 2019.

RHODES, D. G.; MORTON, S.; HYMES, M. A.; FRIDAY, J. E.; MARTIN, C. L.; STEINFELDT, L. C.; MOSHFEGH, A. J. 2020. **USDA Food and Nutrient Database for Dietary Studies (FNDDS), 2017-2018**. Worldwide Web Site: Food Surveys Research Group. Available: <https://www.ars.usda.gov/nea/bhnrc/fsrg/fndds/download>.

RICHART, A.; LOYER, X.; NÉRI, T.; HOWANGYIN, K.; GUÉRIN, C. L.; NGKELO, A.; BAKKER, W.; ZLATANOVA, I.; ROUANET, M.; VILAR, J.; LÉVY, B.; ROTHENBERG, M.; MALLAT, Z.; PUCÉAT, M.; SILVESTRE, J. S. MicroRNA-21 coordinates human

multipotent cardiovascular progenitors therapeutic potential. **Stem Cells**, v. 32, n. 11, p. 2908-22, Nov. 2014.

RIMBACH, G.; MOEHRING, J.; HUEBBE, P.; LODGE, J.K. Gene-regulatory activity of α -tocopherol. **Molecules**, v. 15, n. 3, p. 1746-61, Mar. 2010.

ROESSLER, C.; KUHLMANN, K.; HELLWING, C.; LEIMERT, A.; SCHUMANN, J. Impact of polyunsaturated fatty acids on miRNA profiles of monocytes/macrophages and endothelial cells—A pilot study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 284, Fev. 2017.

RONG, Y.; BAO, W.; SHAN, Z.; LIU, J.; YU, X.; XIA, S.; GAO, H.; et al. Increased MicroRNA-146a Levels in Plasma of Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. **PLoS ONE**, v. 8, 2013.

ROS, E.; MATAIX, J. Fatty acid composition of nuts – implications for cardiovascular health. **British Journal of Nutrition**, v. 96, p. 29-35, Nov. 2006.

ROSELL, M.; KAFOROU, M.; FRONTINI, A.; OKOLO, A.; CHAN, Y. W.; NIKOLOPOULOU, E.; et al. Brown and white adipose tissues: intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 306, n. 8, p. E945-E964, 2014.

ROSEMBAUM, M.; LEIBEL, R. Role of gonadal steroids in the sexual dimorphism in body composition and circulating concentrations of leptin. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, n. 6, p. 1784-9, Jun. 1999.

ROSER, M.; RITCHIE, H.; ORTIZ-OSPINA, E. **World Population Growth—Our World in Data**. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/world-population-growth>>. 2013.

ROSS, S. A.; DAVIS, C. D. The emerging role of microRNAs and nutrition in modulating health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 34, p. 305-336, 2014.

ROSSI, D.J.; BRYDER, D.; SEITA, J.; NUSSENZWEIG, A.; HOEIJMAKERS, J.; WEISSMAN, I. L. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. **Nature**, v. 7;447, n. 7145, p. 725-729, 2007.

RYU, M.-S.; LANGKAMP-HENKEN, B.; CHANG, S.-M.; SHANKAR, M. N.; COUSINS, R. J. Genomic analysis, cytokine expression, and microRNA profiling reveal biomarkers of human dietary zinc depletion and homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 108, n. 52, p. 20970-20975, 2011.

SAHU, A. Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. **Endocrinology**, v. 145, n. 6, p. 2613-20, Jun. 2004.

SCHULTE, C.; KARAKAS, M.; ZELLER, T. microRNAs in cardiovascular disease—Clinical application. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 55, n. 5, p. 687-704, Mai. 2017.

- SEKAR, D.; HAIRUL ISLAM, V. I.; THIRUGNANASAMBANTHAM, K.; SARAVANAN, S. Relevance of miR-21 in HIV and non-HIV-related lymphomas. **Tumour Biology**. 2014.
- SHAH, R.; MURTHY, V.; PACOLD, M.; DANIELSON, K.; TANRIVERDI, K.; LARSON, M. G.; HANSPERS, K.; PICO, A.; MICK, E.; REIS, J.; FERRANTI, S.; FREINKMAN, E.; LEVY, D.; HOFFMANN, U.; OSGANIAN, S.; DAS, S.; FREEDMAN, J. E. Extracellular RNAs are associated with insulin resistance and metabolic phenotypes. **Diabetes Care**, v. 40, p. 546-53, Abr. 2017.
- SHARPLESS, N.E.; DEPINHO, R. A. How stem cells age and why this makes us grow old. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 703-713, 2007.
- SHAW, A. C.; JOSHI, S.; GREENWOOD, H.; PANDA, A.; LORD, J. M. Aging of the innate immune system. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 4, p. 507-13, Ago. 2010.
- SHEN, J.; ZHU, B. Integrated analysis of the gene expression profile and DNA methylation profile of obese patients with type 2 diabetes. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 6, p. 7636-44, Jun. 2018.
- SIDDESHA, J. M.; VALENTE, A. J.; YOSHIDA, T.; SAKAMURI, S. S. V. P.; DELAFONTAINE, P.; IBA, H.; NODA, M.; CHANDRASEKAR, B. Docosahexaenoic acid reverses angiotensin II-induced RECK suppression and cardiac fibroblast migration. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 5, p. 933-41, Mai. 2014.
- SIMIONESCU, N.; NICULESCU, L. S.; SANDA, G. M.; MARGINA, D.; SIMA, A. V. Analysis of circulating microRNAs that are specifically increased in hyperlipidemic and/or hyperglycemic sera. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 9, p. 5765-5773, 2014.
- SLAVIN, J. L.; LLOYD, B. Health Benefits of Fruits and Vegetables. **Advances in Nutrition**, v. 3, n. 4, p. 506-16, Jul. 2012.
- SONG, J. J.; YANG, M.; LIU, Y.; SONG, J. W.; WANG, J.; CHI, H. J.; LIU, X. Y.; ZUO, K.; YANG, X. C.; ZHONG, J. C. MicroRNA-122 aggravates angiotensin II-mediated apoptosis and autophagy imbalance in rat aortic adventitial fibroblasts via the modulation of SIRT6-elabela-ACE2 signaling. **European Journal of Pharmacology**, v. 15, Set. 2020.
- STEINER, A. A.; ROMANOVSKY, A. A. Leptin: At the crossroads of energy balance and systemic inflammation. **Progress in Lipid Research**, v. 46, n. 2, p. 89-107, Mar. 2007.
- STEPHEN, A. M.; CUMMINGS, J. H. Mechanism of action of dietary fibre in the human colon. **Nature**, v. 284, n. 5753, p. 283-284, 1980.
- SUD, N.; ZHANG, H.; PAN, K.; CHENG, X.; CUI, J.; SU, Q. Aberrant expression of microRNA induced by high-fructose diet: implications in the pathogenesis of hyperlipidemia and hepatic insulin resistance. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 43, p. 125-131, Mai. 2017.
- SUN, L. L.; JIANG, B. G.; LI, W. T.; ZOU, J. J.; SHI, Y. Q.; LIU, Z. M. MicroRNA-15a positively regulates insulin synthesis by inhibiting uncoupling protein-2 expression. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 91, n. 1, p. 94-100, Jan. 2011.

TABUNG, F.K.; SMITH-WARNER, S. A.; CHAVARRO, J. E.; WU, K.; FUCHS, C. S.; HU, F. B.; CHAN, A. T.; WILLETT, W. C.; GIOVANNUCCI, E. L. Development and Validation of an Empirical Dietary Inflammatory Index. **Journal of Nutrition**, v. 146, n. 8, p. 1560-70, 2016.

TALENS, R.P.; CHRISTENSEN, K.; PUTTER, H.; WILLEMSSEN, G.; CHRISTIANSEN, L.; KREMER, D.; SUCHIMAN, H.E.; et al. Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. **Aging Cell**, v. 11, n. 4, p. 694-703, 2012.

TANEERA, J.; FADISTA, J.; AHLQVIST, E.; ZHANG, M.; WIERUP, N.; RENSTRÖM, E.; GROOP, L. Expression profiling of cell cycle genes in human pancreatic islets with and without type 2 diabetes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 375, n. 1-2, p. 35-42, Ago. 2013.

TANG, Q. Q.; LANE, M. D. Adipogenesis: From stem cell to adipocyte. **Annual Review of Biochemistry**. 2012.

TANG, H.; LEE, M.; SHARPE, O.; SALAMONE, L.; NOONAN, E. J.; HOANG, C. D.; et al. Oxidative stress-responsive microRNA-320 regulates glycolysis in diverse biological systems. **FASEB J**, v. 26, n. 11, p. 4710-4721, 2012.

TIAN, Y.; SU, L.; WANG, J.; DUAN, X.; JIANG, X. Fruit and vegetable consumption and risk of the metabolic syndrome: a meta-analysis. **Public Health Nutrition**, v. 21, n. 4, p. 756-65, Mar. 2018.

TILI, E.; MICHAILLE, J.-J.; ADAIR, B.; ALDER, H.; LIMAGNE, E.; TACCIOLI, C.; FERRACIN, M.; DELMAS, D.; LATRUFFE, N.; CROCE, C.M. Resveratrol decreases the levels of miR-155 by upregulating miR-663, a microRNA targeting JunB and JunD. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 9, p. 1561-1566, 2010.

TOMÁS-LOBA, A.; FLORES, I.; FERNÁNDEZ-MARCOS, P. J.; CAYUELA, M. L.; MARAVER, A.; TEJERA, A.; BORRÁS, C.; et al. Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. **Cell** 14;135, n. 4, p. 609-622, 2008.

TURCHINOVICH, A.; WEIZ, L.; LANGHEINZ, A.; BURWINKEL, B. Characterization of extracellular circulating microRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 1;39, n. 16, p. 7223-7233, 2011.

VAN GREEVENBROEK, M. M.; SCHALKWJK, C. G.; STEHOUWER, C. D. 2013. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: Causes and consequences. *Netherlands Journal of Medicine*, v. 71, p. 174-187.

VITALE, G.; SALVIOLI, S.; FRANCESCHI, C. Oxidative stress and the ageing endocrine system. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 4, p. 228-240, 2013.

WEISBERG, S.P.; MCCAN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R. L.; FERRANTE JR, A. W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796-808, Dez. 2003.

- VAN HAM, T. J.; HOLMBERG, M. A.; VAN DER GOOT, A. T.; TEULING, E.; GARCIA-ARENCEBIA, M.; KIM, H. E.; DU, D.; et al. Identification of MOAG-4/SERF as a regulator of age-related proteotoxicity. **Cell**, v. 20;142, n. 4, p. 601-612, 2010.
- VARGA, V.; MURÁNYI, Z.; KURUCZ, A.; MARCOLONGO, P.; BENEDETTI, A.; BÁNHEGYI, G.; MARGITTAI, E. Species-specific glucose6-phosphatase activity in the small intestine—Studies in three different mammalian models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 5039, Oct. 2019.
- VICKERS, K.C.; PALMISANO, B. T.; SHOUCRI, B. M.; SHAMBUREK, R. D.; REMALEY, A. T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 423-433, 2011.
- VILLAR, A. V.; GARCÍA, R.; MERINO, D.; LLANO, M.; COBO, M.; MONTALVO, C.; MARTÍN-DURÁN, R.; et al. Myocardial and circulating levels of microRNA-21 reflect left ventricular fibrosis in aortic stenosis patients. **International Journal of Cardiology**, v. 10;167, n. 6, p. 2875-2881, 2013.
- VRIJENS, K.; BOLLATI, V.; NAWROT, T.S. MicroRNAs as potential signatures of environmental exposure or effect: A systematic review. **Environ. Health Perspect.**, v. 123, n. 5, p. 399-411, 2015.
- WANG, Y.; LI, Y.; WANG, X.; ZHANG, D.; ZHANG, H.; WU, Q.; HE, Y.; WANG, J.; ZHANG, L.; XIA, H.; et al. Circulating miR-130b mediates metabolic crosstalk between fat and muscle in overweight/obesity. **Diabetologia**, v. 56, p. 2275-2285, 2013.
- WANG, L.; LV, Y.; LI, G.; XIAO, J. MicroRNAs in heart and circulation during physical exercise. **Journal of Sport and Health Science**, v. 7, n. 4, p. 433-441, 2018.
- WANG, Y.; QIAN, Y.; FANG, Q.; ZHONG, P.; LI, W.; WANG, L.; FU, W.; ZHANG, Y.; XU, Z.; LI, X. Saturated palmitic acid induces myocardial inflammatory injuries through direct binding to TLR4 accessory protein MD2. **Nat. Commun.**, v. 3;8, 2017.
- WANG, X.; SUNDQUIST, J.; ZÖLLER, B.; MEMON, A. A.; PALMÉR, K.; SUNDQUIST, K.; BENNET, L. Determination of 14 circulating microRNAs in Swedes and Iraqis with and without diabetes mellitus type 2. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. 1-8, Jan. 2014.
- WANG, K.; ZHANG, S.; WEBER, J.; BAXTER, D.; GALAS, D. J. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 20, p. 7248-7259, 2010.
- WEALE, C. J., MATSHAZI, D. M.; DAVIDS, S. F. G; RAGHUBEER, S.; ERASMUS, R. T.; KENGNE, A. P.; DAVISON, G. M.; MATSHA, T. E. Circulating miR-30a-5p and miR-182-5p in Prediabetes and Screen-Detected Diabetes Mellitus. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 21, p. 5037-47, Dez. 2020.
- WEN, D.; QIAO, P.; WANG, L. Circulating microRNA-223 as a potential biomarker for obesity. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 9, n. 4, p. 398-404, Jul. 2015.

WILLEIT, P.; SKROBLIN, P.; MOSCHEN, A. R.; YIN, X.; KAUDEWITZ, D.; ZAMPETAKI, A.; BARWARI, T.; WHITEHEAD, M.; RAMÍREZ, C. M.; GOEDEKE, L.; ROTLLAN, N.; BONORA, E.; HUGHES, A. D.; SANTER, P.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C.; TILG, H.; WILLEIT, J.; KIECHL, S.; MAYR, M. Circulating MicroRNA-122 Is Associated With the Risk of New-Onset Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 66, n. 2, p. 347-57, Fev. 2017.

WONG, S. W.; KWON, M.-J.; CHOI, A. M. K.; KIM, H.-P.; NAKAHIRA, K.; HWANG, D. H. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 40, p. 27384-27392, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Healthy diet**. World Health Organization. Regional Office for the Eastern Mediterranean, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **NONCOMMUNICABLE DISEASES: COUNTRY PROFILES 2018**. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Waist Circumference and Waist-Hip Ratio**. Report. Geneva, 2008.

WU, H.; KREN, B. T.; LANE, A. N.; CASSEL, T. A.; HIGASHI, R. M.; FAN, T. W. M.; SCARA, G. S.; SHEKELS, L. L.; KLEIN, M. A.; ALBRECHT, J. H. Cyclin D1 extensively reprograms metabolism to support biosynthetic pathways in Hepatocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 26, Out. 2023.

WU, L.; DAI, X.; ZHAN, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, H.; ZHANG, H.; et al. Profiling peripheral microRNAs in obesity and type 2 diabetes mellitus. **APMIS**, v. 123, n. 7; p. 580-585, 2015.

WU, L.; DAI, X.; ZHAN, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, H.; ZHANG, H.; et al. Profiling peripheral microRNAs in obesity and type 2 diabetes mellitus. **APMIS**, v. 123, n. 7; p. 580-585, 2015.

YANG, M.; LIU, Y.; ZUO, Y.; TANG, H. Sarcopenia for predicting falls and hospitalization in community-dwelling older adults: EWGSOP versus EWGSOP2. **Scientific Reports**, v. 9:17636, 2019.

YILMAZ, O.; BAHAT, G. Muscle mass adjustment method affects association of sarcopenia and sarcopenic obesity with metabolic syndrome. **Geriatric & Gerontology International**, v. 19, n. 3, p. 272. 2019.

ZELJIC, K.; SUPIC, G.; MAGIC, Z. New insights into vitamin D anticancer properties: Focus on miRNA modulation. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 292, n. 3, p. 511-524, Jun. 2017.

ZHANG, G.; LI, J.; PURKAYASTHA, S.; TANG, Y.; ZHANG, H.; YIN, Y.; LI, B.; et al. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-b, NF-kB and GnRH. **Nature**, v. 9:497, n. 7448, p. 211-216, 2013.

ZHANG, Y.; LIU, Y.-J.; LIU, T.; ZHANG, H.; YANG, S.-J. Plasma microRNA-21 is a potential diagnostic biomarker of acute myocardial infarction. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 20, n. 2, p. 323-329, 2016.

ZHANG, X.; PRICE, N. L.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C. Non-coding RNAs in lipid metabolism. **Vascular Pharmacology**, v. 114, p. 93-102, Mar. 2019.

ZHANG, H. G.; ZHANG, Q. J.; LI, B. W.; LI, L. H.; SONG, X. H.; XIONG, C. M.; ZOU, Y. B.; LIU, B. Y.; HAN, J. Q.; XIU, R. J. The circulating level of miR-122 is a potential risk factor for endothelial dysfunction in young patients with essential hypertension. **Hypertension Research**, v. 43, n. 6, p. 511-7, Jun. 2020.

ZHENG, Z.; GE, Y.; ZHANG, J.; XUE, M.; LI, Q.; LIN, D.; MA, W. PUFA diets alter the microRNA expression profiles in an inflammation rat model. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 6, p. 4149-57, Jun. 2015.

ZHONG, Z.; SU, W.; CHEN, H. MicroRNA-532-5p regulates oxidative stress and insulin secretion damage in high glucose-induced pancreatic β cells by downregulating the expression levels of CCND1. **Molecular Medicine Reports**, v. 24, n. 5, Set. 2021.

ZHU, S.; WANG, Z. Body composition: clinical implications and biological diversities. **International Journal of Obesity**, v. 35, p. S1-S3, Mai. 2011.

ZHUANG, G.; MENG, C.; GUO, X.; CHERUKU, P. S.; SHI, L.; XU, H.; LI, H. A novel regulator of macrophage activation: MiR-223 in obesity-associated adipose tissue inflammation. **Circulation**, v. 125, n. 23, p.2892-903, Mai. 2012.

ANEXO 1 - Parecer Consubstanciado de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo

USP - FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FSP/USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão de microRNA no plasma e suas relações com biomarcadores inflamatórios, estado nutricional e padrão alimentar em idosos participantes de estudo de base populacional (ISA Capital)

Pesquisador: Gabrielli Barbosa de Carvalho

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 49221121.4.0000.5421

Instituição Proponente: Faculdade de Saúde Pública USP/SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.938.461

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivos da Pesquisa" e "Avaliação de Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo de informações básicas do projeto PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1785965.pdf, postado em 07/07/2021 e do projeto de pesquisa Projeto_GabrielliBCarvalho.pdf postado em 01/07/2021.

Trata-se da 1.^a versão do projeto de pesquisa Expressão de microRNA no plasma e suas relações com biomarcadores inflamatórios, estado nutricional e padrão alimentar em idosos participantes de estudo de base populacional (ISA Capital), que corresponde a projeto acadêmico de doutorado junto ao Programa de pós graduação Nutrição em Saúde Pública (FSP-USP), será conduzido pelo proponente na condição de pesquisador principal, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero. Com termo de anuência para o uso dos dados do Inquérito de Saúde do Município de São Paulo (ISA-Capital) de responsabilidade da Profa Assoc Regina Mara Fisberg.

Objetivo da Pesquisa:

Consta que o Objetivo Primário é "Analisar o perfil de expressão de miRNA no plasma e investigar a associação destes com biomarcadores de risco cardiometabólico, estado nutricional e dieta em idosos participantes do estudo de base populacional Isa-Capital."

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715		
Bairro: Cerqueira Cesar		CEP: 01.246-904
UF: SP	Município: SAO PAULO	
Telefone: (11)3061-7779	Fax: (11)3061-7779	E-mail: coep@fsp.usp.br

USP - FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FSP/USP



Continuação do Parecer: 4.938.461

Tem como Objetivos Secundários:” - Analisar a expressão de 22 miRNA no plasma relacionados ao metabolismo glicêmico e lipídico, à obesidade e à resposta inflamatória;- Verificar relações entre os miRNA plasmáticos e o estado nutricional (IMC e circunferência da cintura) dos indivíduos avaliados;- Verificar relações entre os miRNA plasmáticos e o perfil lipídico dos indivíduos avaliados;- Verificar relações entre os miRNA plasmáticos e biomarcadores do controle glicêmico dos indivíduos avaliados;- Verificar relações entre os miRNA plasmáticos e biomarcadores inflamatórios (IL-1, IL-6, IL-10, proteína C reativa, TNF-, proteína quimiotática de monócitos 1, inibidor do ativador de plasminogênio 1, adiponectina, leptina, e moléculas de adesão intercelular-1 e vascular-1) dos indivíduos avaliados;- Verificar interações entre os miRNA plasmáticos e os componentes alimentares relacionados à redução ou aumento do risco de desenvolvimento de DCNT.”

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: “A pesquisa em questão apresenta baixos riscos por se tratar de um projeto que utilizará dados secundários. Tendo isto em vista, os riscos são a possibilidade de invasão de privacidade e/ou quebra de sigilo”.

Benefícios: “O estudo não apresenta benefícios diretos aos participantes. No entanto, a execução desse estudo permitirá ampliar os conhecimentos acerca das relações entre o perfil de expressão plasmática de microRNA e biomarcadores cardiometabólicos no contexto das DCNT em uma amostra significativa da população brasileira. Com isso, microRNA plasmáticos podem se apresentar como biomarcadores preditivos do risco de desenvolvimento de DCNT, permitindo assim a utilização prévia de estratégias para a redução do risco e para a ampliação do tratamento dessas doenças”

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto autofinanciado com dados secundários. Está vinculado a pesquisa “Ingestão e status de micronutrientes e sua relação com a inflamação e fatores de risco cardiovascular em residentes do município de São Paulo” (CAAE: 30848914.7.0000.5421). Com isso, o estudo utilizará dados provenientes do Inquérito de Saúde do Município de São Paulo – Isa-Capital 2015, cujas coletas de dados foram realizadas no período de setembro de 2014 a dezembro de 2015, no município de São Paulo.

O Isa-Capital é uma iniciativa conjunta da Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo e o Centro

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 01.246-904
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3061-7779 Fax: (11)3061-7779 E-mail: coep@fsp.usp.br

USP - FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FSP/USP



Continuação do Parecer: 4.938.461

de Apoio à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, com apoio financeiro da SMS-SP, FAPESP e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Criado com o intuito de reunir informações acerca das condições de vida, estado de saúde, estilo de vida e uso de serviços de saúde da população da cidade de São Paulo, o Isa-Capital é realizado em intervalos aproximados de 5 anos e encontra-se na sua terceira edição, nas quais foram geradas diversas publicações de alta relevância científica

Será avaliada uma subamostra de 200 indivíduos idosos (60 anos de idade), residentes na área urbana do município de São Paulo, não-alcoolistas e que não fazem uso de dieta enteral e/ou parenteral. Dessa forma, dados secundários serão utilizados para avaliar os indivíduos quanto às condições socioeconômicas, demográficas, estilo de vida e saúde (questionário de caracterização); ao consumo alimentar (R24h); medidas antropométricas (peso, altura e circunferência de cintura) e da pressão arterial sistêmica; e quanto aos marcadores glicêmicos, lipídicos e inflamatórios. Além disso, será realizada avaliação da expressão de microRNA desses indivíduos

Tem previsto o início da tabulação dos dados em 01/09/2021, e a finalização da pesquisa em 04/02/2024

“Pesquisa de caráter acadêmico para obtenção do título de doutor”

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo “Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações”.

Recomendações:

Vide campo “Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações”.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora propõe a dispensa do TCLE, com a seguinte Justificativa: “A presente proposta utilizará dados secundários provenientes do estudo original (ISA-Capital 2015), com subamostra de 200 participantes. Dessa forma, solicita-se dispensa de TCLE, uma vez que este já foi assinado pelos participantes no estudo original.”

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 01.246-904
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3061-7779 Fax: (11)3061-7779 E-mail: coep@fsp.usp.br

USP - FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FSP/USP



Continuação do Parecer: 4.938.461

Considero justificável a dispensa do TCLE, e, por não terem sido encontrado óbices éticos, encaminho parecer favorável à sua aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Ressalta-se que cabe ao pesquisador responsável encaminhar os relatórios parciais (de 6 em 6 meses) e final da pesquisa, por meio da Plataforma Brasil, via notificação do tipo "relatório" para que sejam devidamente analisados pelo CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1785965.pdf	07/07/2021 10:30:24		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_GabrielliCarvalho.pdf	07/07/2021 10:23:57	Gabrielli Barbosa de Carvalho	Aceito
Outros	Carta_anuencia.pdf	01/07/2021 13:55:22	Gabrielli Barbosa de Carvalho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_infraestrutura_instituicao.pdf	01/07/2021 13:54:33	Gabrielli Barbosa de Carvalho	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	Carta_de_encaminhamento.pdf	01/07/2021 13:40:46	Gabrielli Barbosa de Carvalho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_participacao.pdf	01/07/2021 13:39:31	Gabrielli Barbosa de Carvalho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_GabrielliBCarvalho.pdf	01/07/2021 13:38:55	Gabrielli Barbosa de Carvalho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_ausencia_TCLE.pdf	01/07/2021 13:38:01	Gabrielli Barbosa de Carvalho	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	01/07/2021 13:35:02	Gabrielli Barbosa de Carvalho	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	01/07/2021 13:34:28	Gabrielli Barbosa de Carvalho	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 01.246-904
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3061-7779 Fax: (11)3061-7779 E-mail: coep@fsp.usp.br

USP - FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FSP/USP



Continuação do Parecer: 4.938.461

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 28 de Agosto de 2021

Assinado por:
Kelly Polido Kaneshiro Olympio
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 01.246-904
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3061-7779 Fax: (11)3061-7779 E-mail: coep@fsp.usp.br

ANEXO 2 – Artigo 1 publicado

Clinical Nutrition ESPEN 58 (2023) 320–325



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Nutrition ESPEN

journal homepage: <http://www.clinicalnutritionespen.com>

Original article

Association between circulating micro-ribonucleic acids and metabolic syndrome in older adults from a population-based study

Gabrielli B. Carvalho^a, Tanyara B. Payolla^a, Paula N. Brandão-Lima^a, Flávia M. Sarti^b, Regina M. Fisberg^a, Marcelo M. Rogero^{a,*}^a Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, 715 Dr Arnaldo Avenue, Pacaembu, ZIP Code 01246-904, São Paulo, SP, Brazil
^b School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, 1000 Arlindo Bettio Avenue, ZIP Code 03828-000, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 August 2022

Accepted 19 October 2023

Keywords:

Chronic non-communicable diseases
Metabolic syndrome
Inflammation
Circulating microRNA

SUMMARY

Background and aims: Aging is a major factor in development of chronic non-communicable diseases (NCD). Epigenetic causes are risk factors in NCD development since studies indicate that the expression of micro-ribonucleic acids (miRs) is altered under different clinical conditions. This study aimed to analyze the expression profile of circulating miRs and investigate their association with biomarkers of cardiometabolic risk in older adults living in São Paulo municipality, Brazil.**Methods:** A cross-sectional study was conducted based on the analysis of data from 200 older adults, with a mean age of 69.1 (0.5) years old participating in the ISA-Nutrition. The expression profiles of 21 plasma miRs related to glycemic and lipid metabolism, adiposity, and inflammation were evaluated in relation to cardiometabolic risk. Individuals were distributed into groups according to diagnosis of metabolic syndrome (MetS). The Stata Somersd module was used to calculate confidence intervals for Kendall's tau-a to estimate the correlations among variables.**Results:** Differences in the plasma expression were observed in two of the 21 miRs evaluated according to the MetS presence in participants. Individuals with MetS showed higher expression of miR-30a and miR-122 than individuals without MetS.**Conclusions:** Considering that miR-30, and miR-122 were altered due to MetS, these miRs may be potential biomarkers for MetS in older adults.

© 2023 European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chronic non-communicable diseases (NCD), including obesity, type 2 diabetes, cardiovascular disease, and cancer, are responsible for the highest number of deaths worldwide [1]. In this context, the modifiable risk factors for NCD include smoking, alcoholism, physical inactivity, and unhealthy diet [2]. Aging is considered a non-modifiable risk factor for NCD as it results in progressive loss of physiological integrity, which can lead to impairment of organic functions and greater vulnerability to death [3].

Furthermore, epigenetic factors are included as risk factors for NCD development [2]. The presence of circulating micro-

ribonucleic acids (miRs) in different body fluids, and their plasma expression is altered under different clinical conditions [4]. MiRs are single-stranded, non-coding RNAs containing 18 to 25 nucleotides, that inhibit the protein translation step through interaction with messenger RNA (mRNA) in the 3'-UTR region [5], and are stable molecules present in tissues and several body fluids, including blood [6]. Circulating miRs have been reported as potential biomarkers because they show specific expression patterns during the course of some diseases [7].

Studies have shown associations between circulating miRs expression and metabolic changes in obese individuals, such as chronic systemic low-grade inflammation and insulin resistance [8,9]. Changes in expression of different circulating miRs were observed in individuals with obesity and type 2 diabetes, showing associations with several cardiometabolic risk variables, such as anthropometric indicators and plasma triacylglycerol and glucose concentrations [7,10].

* Corresponding author. Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, 715 Dr Arnaldo Avenue, Pacaembu, ZIP Code 01246-904, São Paulo, SP, Brazil.

E-mail address: mmrogero@usp.br (M.M. Rogero).

<https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2023.10.012>

2405-4577/© 2023 European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Evidence addressing the expression of miRs in older adults with metabolic syndrome is still scarce in the literature, especially with a sample from a population-based study. Thus, the objective of the present study was to analyze the expression profile of 21 circulating miRs and investigate their association with biomarkers of cardiometabolic risk in older adults living in São Paulo, Brazil, who were participants of ISA-Nutrition, a population-based study.

2. Methods

2.1. Study design and participants

This cross-sectional, population-based study evaluated a subsample of 200 older adults (≥ 60 years old) who participated in the São Paulo Health Survey with a focus on nutrition (ISA-Nutrition 2015). Data were collected from February 2015 to February 2016 in São Paulo city [11].

The subsample was selected according to the following exclusion criteria: plasma samples that indicated the presence of hemolysis and/or insufficient volume, the presence of acute inflammatory diseases, cancer, and the use of drugs that could interfere with the markers of interest (antibiotics, anti-inflammatory, immunomodulatory, and antiretroviral). In addition, only individuals with complete data for anthropometric variables, systemic blood pressure, and glycemic and lipid biomarkers were selected.

The study was approved by the Research Ethics Committee of the School of Public Health of the University of São Paulo (# 49221121.4.0000.5421 and # 30848914.7.0000.5421 for Isa-Nutrition). Written informed consent was obtained from all the participants.

2.2. Clinical and biochemical analysis

Weight, height, and waist circumference were performed according to standardized protocols. The weight was measured in kilograms using a calibrated platform-type digital scale (Tanita®, model HD-313, Arlington Heights, IL, USA, maximum capacity of 150 kg, and precision of 100 g) [11]. A portable stadiometer (Seca®, model 208, Cotia, SP, Brazil, maximum measurement of 200 cm, and precision of 0.1 cm) fixed on a smooth wall, without a baseboard, was used for the measurement of height in centimeters [11]. The mean values of weight and height of each individual in the study were used to calculate body mass index (BMI), defined as body mass in kilograms divided by the square of height in meters (kg/m^2). BMI values were used to classify the individual's anthropometric nutritional status according to the criteria standardized by the Pan American Health Organization [12].

Waist circumference (WC) was measured using inextensible metric tape, positioned above the midpoint, between the last costal arch and the iliac crest of the standing participants, during expiration [11]. The WC was used for the diagnosis of central obesity according to the criteria defined by the WHO: ≥ 102 cm for men and ≥ 88 cm for women [13]. Blood pressure was measured in triplicate in the right arms using an automatic device (Omron model HEM-712C, Omron HealthCare, Inc., Kyoto, Japan).

Approximately 30 mL of fasting blood was collected from participants (12–14 h) through venipuncture with the aid of sterile and disposable syringes by specialized professionals at the participants' homes, according to prior appointments. Participants were instructed not to consume alcoholic beverages 72 h before blood collection, as well as to avoid intense physical exercise the day before and on the day of blood collection.

Fasting blood glucose concentration was determined by enzymatic colorimetric assay of glucose oxidase (Cobas®; Roche

Diagnostics GmbH, Mannheim, BW, Germany). Plasma insulin was measured by multiplex immunoassay (LINCOplex®, Linco Research Inc., St. Charles, MO, USA). The homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) was calculated from fasting glucose and insulin as $[\text{fasting glucose (mg/dL)} \times \text{fasting plasma insulin } (\mu\text{IU/mL})]/405$. The cutoff point adopted for HOMA1-IR was 2.71, as proposed by Geloneze et al. [14], and was validated for the Brazilian population.

The lipid profile was determined by an enzymatic and colorimetric method (Cobas®; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BW, Germany). The plasma concentration of VLDL-c was calculated by dividing the plasma concentration of triacylglycerols by five.

2.3. miR expression

After an intense search in literature, looking for the main miRs related to variables associated to non-communicable diseases, such as glycemic, lipid and inflammatory biomarkers and overweight/obesity variables, 21 miRs were selected to be analyzed in this study (Table 1).

The expression of 21 miRs (miR-15a-5p, miR-16-5p, miR-21-5p, miR-28-3p, miR-30a-5p, miR-30d-5p, miR-122-5p, miR-126-3p, miR-130b-3p, miR-139-3p, miR-140-5p, miR-146a-5p, miR-150-5p, miR-222-3p, miR-223-3p, miR-363-3p, miR-375-3p, miR-376a-3p, miR-486-5p, miR-532-5p, miR-let-7c-5p) was analyzed in aliquots of plasma collected in EDTA, using real-time qPCR (Biomark System FC1 Cyder Fluidigm) with BioMark™ 96.96 Fluidigm Dynamic Array (PJ1910334). All samples were controlled for hemolysis by measurement of free hemoglobin at 414 nm using a NanoQuant plate in a TECAN (Männedorf, Switzerland) spectrophotometer.

RNA was extracted from 300 μL plasma using Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA Purification Kit (Slurry Format) (Norgen®, Thorold, ON, Canada, Cat. 42800). All the samples were spiked with cel-miR-39-3p at 2.7^{-4} μM (IDT). RNA was eluted in 80 μL elution buffer. The reverse transcription was performed with 15 μL of RNA eluted solution using miRCURY LNA RT kit (Cat.339340, Qiagen-France), as described by supplier's instructions. All reactions were spiked using UniSP6 (part of Spike-in kit Cat.339390, Qiagen-France, Coutaboeuf).

Pre-amplification was performed using miRCURY LNA miRNA PCR Assay primers (Cat.339306; Qiagen-France, Coutaboeuf) for the 21 miRs of interest plus RT Spike-in UniSp6 and Extraction Spike-in Cel-miR-39. The reverse transcription product was purified using exonuclease I (Cat. MO293; New England Biolabs France, Evry) and diluted at a ratio of 1:10. Then, 1.25 μL of diluted cDNA was pre-

Table 1
Main miRs found in the literature which were related to cardiometabolic risk variables.

Association	miR		References
	Downregulated	Upregulated	
Overweight/obesity	miR-130b miR-146b miR-223 miR-376a	miR-16 miR-140-5p miR-222	[7,15–17]
Inflammation	miR-28-3p miR-126	miR-363 miR-486-5p	[7,16,18–21]
Glycemic metabolism	miR-15a miR-21 miR-30d miR-375	miR-30 a-5p miR-122 miR-150	[20–22]
Lipid metabolism	miR-139-3p miR-532-5p miR-let-7c	-	[7,16,17,23]

Table 2
Characterization of the subsample of older adults participating in the ISA-Nutrition population-based study, according to the presence of the metabolic syndrome.

Variables	Total (n = 193)	No MetS (n = 67)	MetS (n = 126)	p-value
Sex, n (%)				
Male	92 (49.4)	30 (45.1)	62 (51.7)	0.374
Female	101 (50.6)	45 (54.9)	56 (48.3)	
Age (years)	69.1 (0.5)	69.6 (1.0)	68.8 (0.7)	0.514
Body weight (kg)	72.1 (1.1)	68.8 (1.4)	74.0 (1.4)	0.011*
Stature (m)	1.6 (0.1)	1.6 (0.1)	1.6 (0.1)	0.899
BMI (kg/m ²)	27.5 (0.4)	26.2 (0.5)	28.2 (0.4)	0.002*
BMI classification, n (%)				
Low weight	34 (15.9)	19 (25.0)	15 (10.9)	0.016*
Normal weight	75 (39.0)	28 (41.8)	47 (37.4)	
Overweight/Obesity	87 (45.1)	22 (33.2)	65 (51.7)	
WC (cm)	99.8 (1.3)	95.5 (1.5)	102.0 (1.6)	0.002*
SBP (mmHg)	138.2 (1.4)	130.3 (2.0)	142.4 (2.0)	<0.001*
DBP (mmHg)	76.2 (0.7)	72.9 (1.1)	78.0 (1.0)	0.002*
Physical activity (minutes per week)	658.8 (68.8)	595.3 (66.4)	778.7 (148.7)	0.256
Total cholesterol (mg/dL)	184.0 (3.7)	183.0 (5.4)	184.5 (4.0)	0.775
HDL-c (mg/dL)	47.2 (1.4)	54.8 (1.4)	43.1 (1.6)	<0.001*
LDL-c (mg/dL)	110.4 (3.4)	109.6 (4.7)	110.9 (3.7)	0.785
VLDL-c (mg/dL)	26.3 (1.0)	18.6 (0.7)	30.5 (1.2)	<0.001*
Non-HDL cholesterol (mg/dL)	136.7 (3.4)	128.2 (5.0)	141.4 (3.7)	0.014*
Triacylglycerols (mg/dL)	131.3 (4.9)	92.6 (3.5)	152.4 (6.1)	<0.001*
Fasting glucose (mg/dL)	111.5 (2.5)	95.6 (2.7)	120.3 (3.6)	<0.001*
Fasting insulin (μU/mL)	13.0 (0.8)	9.5 (0.7)	15.0 (1.0)	<0.001*
HOMA-IR	3.8 (0.3)	2.2 (0.2)	4.6 (0.4)	<0.001*

Data presented in absolute and relative frequencies (n, %) and mean (standard error). *Difference between groups with and without metabolic syndrome. Chi-square test for categorical variables. Mann–Whitney test for continuous variables. MetS, metabolic syndrome; BMI, body mass index; WC, waist circumference; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; HDL-c, high-density lipoprotein-associated cholesterol; LDL-c, low-density lipoprotein-associated cholesterol; VLDL-c, very low-density lipoprotein-associated cholesterol; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance. Diagnosis of nutritional status according to Pan American Health Organization criteria (2002). Diagnosis of metabolic syndrome according to the International Diabetes Federation (2005).

amplified using Fluidigm PreAmp Master mix (Cat 100–5580, Les Ulis-France) and primers mix in a 5 μL reaction volume according to the supplier's specifications.

For each assay qPCR was performed in triplicate from 1.5 μL of diluted preamplification product (1:10) using Biotium Fast Probe Master Mix (Cat.310005, Fremont, CA) in dynamic arrays 96 × 96 IFC (Cat. BMK-M-96.96) on Biomark™ (Fluidigm, Les Ulis-France), according to the supplier's protocol.

Raw Ct values greater than 40 were considered undetectable. The DCT method was used to calculate relative expression values. The first normalization step adjusted the raw Ct values to the recovered levels of spike-in cel-miR-39 and Spike-in UniSp6. The second normalization step subtracted the normalized Ct for individual samples from the mean of all individual assays for each miR. The fold-change values calculated from the normalized DCT data were used for statistical analysis.

2.4. Bioinformatics analysis

The bioinformatics software TargetScan (<http://www.targetscan.org>) was used to identify potential targets of miR-21, miR-28, miR-30a, miR-122, miR-130b, miR-223, and miR-376a.

2.5. Statistical analysis

Variables were tested for normality using the Shapiro–Wilk test, and subsequent tests were chosen considering the absence of normality in the distribution. Data were presented as mean and standard error.

The adjusted Wald test was used to compare the plasma miR expression of individuals grouped by metabolic syndrome (MetS) status (yes/no). MetS was defined according to the classification of the International Diabetes Federation (2005) [24] by the presence of WC ≥ 80 cm for women or ≥ 90 cm for men, plus any two of the following four factors: HDL-c < 50 mg/dL for women or < 40 mg/dL for men, triglycerides ≥ 150 mg/dL, systolic blood pressure (SBP) ≥ 130 or diastolic blood pressure (DBP) ≥ 85 mmHg, and fasting blood glucose ≥ 100 mg/dL.

Kendall's tau-a was used to estimate the correlation between plasma miR expression and lipid, glycemic, and anthropometric variables, including confidence intervals, using a complex survey design to ensure representativeness at the population level.

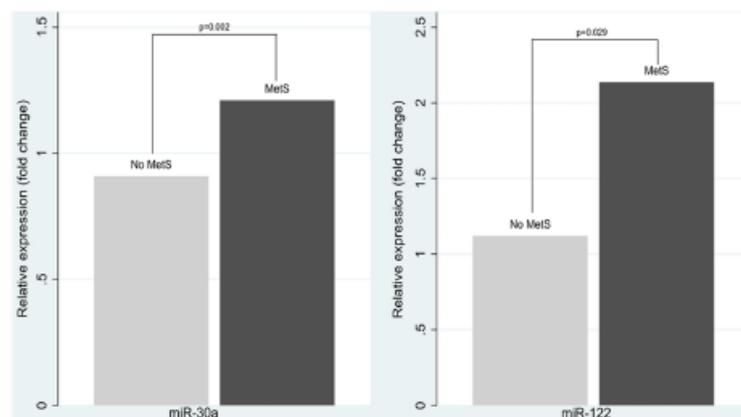


Fig. 1. Plasma expression of miR-30a and miR-122 in older adults according to MetS diagnosis (n = 193). MetS diagnosis according to International Diabetes Federation (2005). Data presented as mean and standard error. The adjusted Wald test was performed.

Analyses were performed using the Stata/SE software (version 17.0) with a significance level of 0.05.

3. Results

The final sample included 193 participants, since four individuals presented a blood sample with hemolysis, two individuals with inhibition in the PCR assay, and one participant was considered an outlier.

The characteristics of the samples evaluated in this study are listed in Table 2. From the evaluated sample, 52.3 % were from women, with a mean age of 69.1 (0.5) years. Moreover, 45.1 % of the sample were from individuals with overweight/obesity, in addition to having high mean WC values, according to the World Health Organization - WHO (2008) [13]. Furthermore, 65.3 % of the participants had MetS and 53.4 % had insulin resistance. It was also observed that older adults with MetS had higher values of body weight, BMI, WC, SBP, DBP, glycemia, insulinemia, HOMA-IR and

Table 3
Correlations between miRs and anthropometric, glycemic and lipid variables, and blood pressure in older adults participating in the ISA-Nutrition population-based study (n = 193).

		miR-122	miR-30a
Body weight (kg)	Coefficient	0.068	0.084
	95 % CI	-0.029–0.167	-0.025–0.194
	p-value	0.167	0.128
BMI (kg/m ²)	Coefficient	0.041	0.026
	95 % CI	-0.045–0.127	-0.074–0.127
	p-value	0.345	0.608
WC (cm)	Coefficient	0.053	0.052
	95 % CI	-0.043–0.151	-0.050–0.154
	p-value	0.274	0.316
SBP (mmHg)	Coefficient	0.044	0.099
	95 % CI	-0.063–0.152	-0.009–0.208
	p-value	0.421	0.073
DBP (mmHg)	Coefficient	0.111	0.110
	95 % CI	-0.003–0.226	0.005–0.217
	p-value	0.056	0.041*
Fasting glucose (mg/dL)	Coefficient	0.141	0.120
	95 % CI	0.343–0.249	0.016–0.224
	p-value	0.010*	0.023*
Fasting insulin (μU/mL)	Coefficient	0.128	0.131
	95 % CI	0.017–0.240	0.018–0.245
	p-value	0.023*	0.024*
HOMA1-IR	Coefficient	0.159	0.161
	95 % CI	0.044–0.274	0.046–0.276
	p-value	0.007*	0.006*
Total cholesterol (mg/dL)	Coefficient	0.104	0.091
	95 % CI	-0.003–0.212	-0.018–0.201
	p-value	0.057	0.102
HDL-c (mg/dL)	Coefficient	-0.126	-0.168
	95 % CI	-0.226–0.026	-0.276–0.062
	p-value	0.014*	0.002**
VLDL-c (mg/dL)	Coefficient	0.068	0.116
	95 % CI	-0.037–0.175	0.015–0.217
	p-value	0.204	0.024*
LDL-c (mg/dL)	Coefficient	0.122	0.129
	95 % CI	0.011–0.234	0.021–0.237
	p-value	0.031*	0.019*
Non-HDL-c (mg/dL)	Coefficient	0.144	0.159
	95 % CI	0.025–0.254	0.054–0.264
	p-value	0.010*	0.003**
Triacylglycerols (mg/dL)	Coefficient	0.069	0.116
	95 % CI	-0.037–0.176	0.016–0.218
	p-value	0.200	0.024*

* Correlation is significant at $p < 0.05$. ** Correlation is significant at $p < 0.005$. BMI, body mass index; WC, waist circumference; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; HDL-c, high-density lipoprotein-associated cholesterol; VLDL-c, very low-density lipoprotein-associated cholesterol; LDL-c, low-density lipoprotein-associated cholesterol.

plasma concentrations of VLDL-c, non-HDL cholesterol, and triacylglycerols and lower plasma concentrations of HDL-c.

The plasma expression of miR-122 and miR-30a was higher in individuals with MetS than in those without MetS (Fig. 1).

Correlations between miRs and anthropometric, glycemic, and lipid variables, and blood pressure are shown in Table 3. Correlations were performed with miRs that presented different expressions according to MetS status. The expression of miR-122 and miR-30a was positively correlated with glycemia, insulinemia, HOMA-IR, LDL-c, and non-HDL cholesterol. In addition, the plasma expression of miR-30a showed a positive correlation with DBP and plasma triacylglycerol concentration (Table 3).

Furthermore, for the two miRs that, in the present study, showed changes in their expression according to the presence of MetS (miR-30a and miR-122), their potential biological targets were identified, as shown in Table 4.

4. Discussion

Majority of the older adults were diagnosed with MetS and insulin resistance. Notably, individuals with MetS had poor glycemic and lipid control, as indicated by the high values of VLDL-c, non-HDL cholesterol, triacylglycerols, fasting glucose, fasting insulin, HOMA-IR, and reduced HDL-c values. Furthermore, individuals with MetS presented with high blood pressure. Regarding circulating miRs, altered expression was observed in miR-30a and miR-122, when the expression of these miRs was evaluated according to MetS status. Moreover, these miRs showed correlations with diastolic blood pressure, and biomarkers related to glycemic and lipid metabolism.

Hypertrophy and hyperplasia of adipocytes present in obesity are associated with insulin resistance, which is one of the key factors that trigger metabolic disorders that culminate in MetS and NCD [25]. Thus, the expansion of white adipose tissue promotes the exacerbated secretion of adipokines, especially pro-inflammatory cytokines, which trigger a state of chronic systemic low-intensity inflammation called metabolic inflammation [26,27]. In this context, it should be highlighted that changes in plasma miRs expression observed in individuals with MetS from the present study can be associated with anthropometric variables, and glycemic, lipid, and inflammatory biomarkers [7,19].

Weale et al. [28] verified a higher expression of miR-30a in adult individuals with pre-diabetes or type 2 diabetes than in normoglycemic individuals. In the present study, this miR was more highly expressed in individuals with MetS than in those without MetS. The miR-30a regulates mitochondrial oxidative capacity in human adipocytes [29], probably by increasing the expression of genes involved in the insulin signaling pathway and oxidative metabolism. In diabetic mice, increased magnification of miR-30a was observed to promote "darkening" of white adipose tissue, increase sensitivity to insulin action, and stimulate the expression of genes associated with energy expenditure [29].

In addition, it has been observed that miR-30a has as target genes the forkhead box protein O1 (FOXO1) and the insulin receptor substrate-1 (IRS-1). These genes are related to pancreatic beta cell dysfunction and hepatic and peripheral insulin resistance, as they interfere with insulin signaling and response to glucotoxicity [30–32]. Furthermore, the IRS-1 gene, whose expression can be reduced with increased expression of miR-30a-5p, is involved in glycemic and lipid metabolism, which may lead to hepatic insulin resistance and hyperlipidemia [21].

Regarding miR-122, this was the first miR to be associated with metabolic control. It is primarily expressed in the liver and was initially shown to affect hepatic cholesterol and fatty acid metabolism in mice [33]. In the present study, this miR showed higher

Table 4
Potential targets for miR-21, miR-28, miR-30a, miR-122, miR-130b, miR-223 and miR-376a.

miR	Potential target	Function
miR-30a	SLC2A12	This gene is an insulin-independent facilitating glucose transporter that belongs to a family of transporters that catalyze the uptake of sugars by facilitated diffusion. Furthermore, this gene regulates mitochondrial oxidative capacity in human adipocytes.
	FOXO1	This gene belongs to the forkhead family of transcription factors which are characterized by a distinct forkhead domain. This gene may play a role in myogenic growth and differentiation. The FOXO1 protein regulates cellular metabolism in the liver, muscle, adipose tissue and pancreas. Alterations in FOXO1 function might result in disorders of metabolism, including diabetes.
	IRS-1	This gene encodes a protein which is phosphorylated by insulin receptor tyrosine kinase. Mutations in this gene are associated with type II diabetes and susceptibility to insulin resistance. Among its related pathways are IL-9 signaling pathways and insulin receptor signaling cascade.
miR-122	G6PC	This gene (G6PC) is one of the three glucose-6-phosphatase catalytic subunit-encoding genes in humans: G6PC, G6PC2 and G6PC3. Glucose-6-phosphatase is a key enzyme in glucose homeostasis, functioning in gluconeogenesis and glycogenolysis.
	PPKAB1	Regulatory subunit of AMPK, which is a heterotrimer with an alpha catalytic subunit, and non-catalytic beta and gamma subunits.

SLC2A12, Solute Carrier Family 2 Member 12; FOXO1, Forkhead box protein O1; IRS-1, Insulin receptor substrate 1; G6PC, glucose-6-phosphatase catalytic subunit; PKK, protein kinase B; AMPK, AMP-activated protein kinase.

expression in individuals with MetS and was also positively correlated with glycemia, insulinemia, HOMA-IR, LDL-c, and non-HDL cholesterol. Wang et al. [34] observed higher expression of miR-122 in obese individuals compared to those with adequate weight or those who were overweight, in addition to being positively correlated with BMI, triglycerides, and HOMA-IR, and negatively correlated with HDL-c. In addition, Willeit et al. [35] observed an association between miR-122 expression and the risk of MetS and recent onset of type 2 diabetes in a study that evaluated 810 participants with a mean age of 63 years.

The main targets of miR-122 are G6PC and PPKAB1. The first gene encodes glucose-6-phosphatase in humans, which is a key enzyme in glycemic homeostasis [36]. Studies have shown correlations between high miR-122 expression and insulin resistance in individuals with type 2 diabetes or insulin resistance [37]. In the present study, PPKAB1 was identified as a potential target of miR-122, which is a subunit of AMP-activated protein kinase (AMPK), a key regulator of insulin resistance in the muscle [37]. Considering that the main targets found for this miR are related to glucose homeostasis, the results of the present study are consistent with the findings in literature.

In addition, miR-122 plays a key role in the regulation of cardiovascular fibrosis and endothelial function in individuals diagnosed with hypertension [38]. MiR-122 was upregulated in subjects with hypertension, indicating its role as a predictive risk factor in homeostasis and cardiovascular disorders [39]. miR-122 is a well-known marker of cardiovascular events and is a good predictor of atherosclerosis. This miR was shown to be upregulated in participants with atherosclerotic lesions, with serum miR-122 expression positively correlated with atherosclerotic severity [40].

The present study has several strengths and limitations. Among the strengths, we can mention the sample size, which is a differential in this study, since most studies using miRs have a small sample size. In addition, the sample was obtained from a population-based study, being representative of the population of São municipality, the largest city in Brazil, allowing the visualization of a broader scenario, since the sample weight was considered for all analyses. Furthermore, individuals who had blood samples with hemolysis or acute inflammatory diseases and/or cancer were not selected for the study, thus removing the influence of these conditions on the results. However, in terms of limitations of the study, the adoption of a bioinformatics tool to predict the main target genes for each miR can be mentioned, since the direct measures could not be performed. Lastly, considering that this research is based on a cross-sectional dataset, a causal relationship could not be inferred.

In summary, this study shows that MetS can alter the expression of circulating miRs in older adults. Considering that two miRs (miR-

30 and miR-122) were altered by the presence of MetS, it can be inferred that these miRs may be considered as potential biomarkers for MetS in older adults.

Research data

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Funding

This paper was supported by the São Paulo Research Foundation - FAPESP (Grant 2020/03104-5 | Grant 2019/22934-1); National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (Grant 150834/2020-9). The sponsors had no role in the study design, collection, analysis, interpretation of data, writing of the report, or decision to submit the article for publication.

CRediT author statement

GBC - Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing- Original draft preparation, PNB-L – Writing-Original draft preparation, TBP – Writing-Original draft preparation, FMS: Formal analysis, Writing- Reviewing and Editing, RMF: Writing- Reviewing and Editing, MMR: Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing- Reviewing and Editing. All authors have read and approved the version of the paper.

Declaration of competing interests

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- [1] Malta DC, Andrade SSCA, Oliveira TP, Moura L, Prado RR, Souza MEM. Probabilidade de morte prematura por doenças crônicas não transmissíveis, Brasil e regiões, projeções para 2025, vol. 22. *Revista Brasileira de Epidemiologia*; 2019. <https://doi.org/10.1590/1980-549720190030>.
- [2] World Health Organization (WHO). Noncommunicable diseases: country profiles. 2018. World Health Organization (online). Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274512>. [Accessed 19 March 2022].
- [3] López-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 2013;153. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>.
- [4] Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* 2010;101. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01650.x>.
- [5] Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev* 2014;15. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.
- [6] Keller A, Leidinger P, Bauer A, Elsharawy A, Haas J, Backes C, et al. Toward the blood-borne miRNome of human diseases. *Nat Methods* 2011;8:841–3.

- [7] Ortega FJ, Mercader JM, Rovira O, Guerra E, Esteve E, Xifra G, et al. Profiling of circulating MicroRNAs reveals common MicroRNAs linked to type 2 diabetes that change with insulin sensitization. *Diabetes Care* 2014;37:1375–83.
- [8] Hulsmans M, Keyzer D, Halvoet P. MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis. *FASEB J* 2011;25. <https://doi.org/10.1096/fj.11-181149>.
- [9] Heneghan HM, Miller N, Mganena OJ, O'Brien T, Kerin MJ. Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-2701>.
- [10] Ma X, Buscaglia LEB, Barker JR, Li Y. MicroRNAs in NF- κ B signaling. *J Mol Cell Biol* 2011;3. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjr007>.
- [11] Fisberg RM, Sales CH, Fontaneli MM, Pereira JL, Alves MCGP, Escuder MML, et al. 2015 Health survey of São Paulo with focus in nutrition: rationale, design, and procedures. *Nutrients* 2018;10:1–13.
- [12] Pan American Health Organization (PAHO). XXXVI Reunión del Comité Asesor de Investigaciones en Salud – encuesta Multicéntrica – salud Bienestar y Envejecimiento (SABE) en América Latina y el Caribe – informe preliminar 2002 (online). Available at: <http://www.opas.org/program/sabe.html>. [Accessed 12 February 2022].
- [13] World Health Organization (WHO). Waist circumference and waist-hip ratio. *World Health Organization*; 2008 (online). Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241501491>. [Accessed 12 February 2022].
- [14] Geloneze B, Vasques ACJ, Stabe CFC, Pareja JC, Rosado IEPJ, Queiroz EC, et al. HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome: Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009;53:281–7.
- [15] Ma E, Fu Y, Garvey WT. Relationship of circulating miRNAs with insulin sensitivity and associated metabolic risk factors in humans. *Metab Syndr Relat Disord* 2018;16:82–9.
- [16] Prats-Puig A, Ortega FJ, Mercader JM, et al. Changes in circulating microRNAs are associated with childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98: E1655–60.
- [17] Zhao H, Shen J, Daniel-MacDougall C, Wu X, Chow WH. Plasma MicroRNA signature predicting weight gain among Mexican-American women. *Obesity* 2017;25:598–604.
- [18] Candia PD, Spinetti G, Specchia C, Sangalli E, Sala LL, Uccellatore A, et al. A unique plasma microRNA profile defines type 2 diabetes progression. *PLoS One* 2017;12:e0188980.
- [19] Donghui T, Shuang B, Xulong L, Meng Y, Yujing G, Yujie H, et al. Improvement of microvascular endothelial dysfunction induced by exercise and diet is associated with microRNA-126 in obese adolescents. *Microvasc Res* 2019;123: 86–91.
- [20] Zampetaki A, Kiechl S, Druzdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. Plasma MicroRNA profiling reveals loss of endothelial MIR-126 and other MicroRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* 2010;107:810–7.
- [21] Sud N, Zhang H, Pan K, Cheng X, Cui J, Su Q. Aberrant expression of microRNA induced by high-fructose diet: implications in the pathogenesis of hyperlipidemia and hepatic insulin resistance. *J Nutr Biochem* 2017;43: 125–31.
- [22] Jiménez-Lucena R, Camargo A, Alcalá-Díaz JF, Romero-Baldonado C, Luque RM, van Ormonen B, et al. A plasma circulating miRNAs profile predicts type 2 diabetes mellitus and prediabetes: from the CORDIOPREV study. *Experimental & Molecular Medicine* 2018;26:1–12.
- [23] Giardina S, Hernandez-Alonso R, Díaz-López A, Salas-Huetos A, Salas-Salvado J, Bulló M. Changes in circulating miRNAs in healthy overweight and obese subjects: Effect of diet composition and weight loss. *Clinical Nutrition* 2019;38:438–43.
- [24] International Diabetes Federation (IDF). The IDF consensus worldwide definition on the Metabolic Syndrome. International Diabetes Federation (online). 2005. Available at: <https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idf-consensus-worldwide-definition-of-the-metabolic-syndrome.html#:~:text=IDF%20consensus%20Worldwide%20definition%20of%20cholesterol%20and%20high%20blood%20pressure>. Accessed 12 February 2022.
- [25] Zhu S, Wang Z. Body composition: clinical implications and biological diversities. *Int J Obes* 2011;35. <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.09>.
- [26] Dali-Youcef N, Mecili M, Ricci R, Andrés E. Metabolic inflammation: Connecting obesity and insulin resistance. *Ann Med* 2013;45. <https://doi.org/10.3109/07853890.2012.705015>.
- [27] Mahdavi R, Ghorbani S, Alipoor B, Panahi G, Khodabandehloo H, Esfahani EN, et al. Decreased Serum Level of miR-155 is Associated with Obesity and its Related Metabolic Traits. *Clin Lab* 2018;1:77–84.
- [28] Weale CJ, Matchaiz DM, Davids SFC, Raghuveer S, Erasmus RT, Kengne AP, et al. Circulating miR-30a-5p and miR-182-5p in Prediabetes and Screen-Detected Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2020;21:5037–47.
- [29] Koh EH, Chen Y, Bader DA, Hamilton MP, He B. Mitochondrial Activity in Human White Adipocytes Is Regulated by the Ubiquitin Carrier Protein 9/miR-30a Axis. *J Biol Chem* 2016;291:24747–55.
- [30] Ebrahimi R, Bahraee A, Nazpour F, Emamgholipour S, Meshkini R. The role of microRNAs in the regulation of insulin signaling pathway with respect to metabolic and mitogenic cascades: A review. *J Cell Biochem* 2019;120:19290–309.
- [31] Furuyama T, Kitayama K, Yamashita H, Mori N. Forkhead transcription factor FOXO1 (FKHR)-dependent induction of PDK4 gene expression in skeletal muscle during energy deprivation. *Biochem J* 2003;375:365–71.
- [32] Coops KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia* 2012;55:2565–82.
- [33] Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 2006;3:87–98.
- [34] Wang X, Sundquist J, Zöller B, Memon AA, Palmér K, Sundquist K, et al. Determination of 14 circulating microRNAs in Swedes and Iraqis with and without diabetes mellitus type 2. *PLoS ONE* 2014;9:1–8.
- [35] Willeit P, Skrobilin P, Moschen AR, Yin X, Kaudewitz D, Zampetaki A, et al. Circulating MicroRNA-122 is Associated With the Risk of New-Onset Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2017;66:347–57.
- [36] Varga V, Murranyi Z, Kurucz A, Marcolongo P, Benedetti A, Bánhegyi G, et al. Species-specific glucosyl-phosphatase activity in the small intestine—Studies in three different mammalian models. *Int J Mol Sci* 2019;20:5039.
- [37] Shah R, Murthy V, Facold M, Danielson K, Tanriverdi K, Larson MG, et al. Extracellular RNAs are associated with insulin resistance and metabolic phenotypes. *Diabetes Care* 2017;40:546–53.
- [38] Song JJ, Yang M, Liu Y, Song JW, Wang J, Chi HJ, et al. MicroRNA-122 aggravates angiotensin II-mediated apoptosis and autophagy imbalance in rat aortic adventitial fibroblasts via the modulation of SIRI6-elabela-ACE2 signaling. *Eur J Pharmacol* 2020;15.
- [39] Zhang HG, Zhang QJ, Li BW, Li LH, Song XH, Xiong CM, et al. The circulating level of miR-122 is a potential risk factor for endothelial dysfunction in young patients with essential hypertension. *Hypertens Res* 2020;43:511–7.
- [40] Li Y, Yang N, Dong B, Yang J, Kou L, Qin Q. MicroRNA-122 promotes endothelial cell apoptosis by targeting XIAP: Therapeutic implication for atherosclerosis. *Life Sci* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116590>.

ANEXO 3 – Artigo 2 publicado

Inflammation
<https://doi.org/10.1007/s10753-023-01867-6>

RESEARCH



Circulating MiRNAs Are Associated With Low-grade Systemic Inflammation and Leptin Levels in Older Adults

Gabrielli B. Carvalho¹, Paula N. Brandão-Lima¹, Tanyara B. Payolla¹,
 Sadraque E. F. Lucena², Flávia M. Sartí³, Regina M. Fisberg¹ and Marcelo M. Rogero^{1,4}

Received 10 May 2023; accepted 27 June 2023

Abstract— Inflammaging refers to the low-grade systemic inflammation that occurs with aging present in chronic non-communicable diseases. MicroRNAs (miRNAs) are potential biomarkers for these diseases in older adults. This study aimed to assess the expression of 21 circulating miRNAs and their associations with inflammatory biomarkers in older adults. This cross-sectional study was performed with 200 individuals participating in ISA-Nutrition. The systemic low-grade inflammation score (SIS) was calculated from the plasma concentration of 10 inflammatory biomarkers. Circulating miRNA expression was assessed using the Fluidigm method. Wilcoxon-Mann-Whitney test was employed to determine differences in SIS among groups distributed according to sex and presence of MetS. Spearman's correlation was used to estimate correlations among SIS, leptin levels, miRNA expression, and variables of interest. Analyses were performed using software R version 4.2.3, with a significance level of 0.05. The final sample consisted of 193 individuals with a mean age of 69.1 (SE=0.5) years, being 64.7% individuals with metabolic syndrome (MetS). Positive correlations were observed between leptin concentration and metabolic risk factors, and leptin concentration was higher in individuals with MetS compared to those without MetS. The expression of 15 circulating miRNAs was negatively correlated with leptin concentration. GLMs showed negative associations between miRNAs (miR-15a, miR-16, miR-223, miR-363, miR-532), leptin, and/or SIS values; and only miR-21 showed positive association with SIS values. The results suggest the presence of peripheral leptin resistance associated with low-grade inflammation and plasma expression of miRNAs in older adults. These findings suggest the potential role of miRNAs as biomarkers for cardiometabolic risk.

KEY WORDS: circulating microRNA; inflammation; chronic non-communicable diseases; leptin

¹Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, 715 Dr. Arnaldo Avenue, São Paulo, SP 01246-904, Brazil

²Department of Statistics and Actuarial Sciences, Federal University of Sergipe, Marechal Rondon Avenue, São Cristóvão, SE 49100-000, Brazil

³School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, 1000 Arlindo Bettio Avenue, São Paulo, SP 03828-000, Brazil

⁴To whom correspondence should be addressed at Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, 715 Dr. Arnaldo Avenue, São Paulo, SP, 01246-904, Brazil. Email: mmrogero@usp.br

INTRODUCTION

High concentrations of pro-inflammatory cytokines and acute phase proteins and increased immune cell infiltration into insulin-dependent tissues characterize low-grade systemic inflammation [1, 2]. This inflammation is closely related to the development of chronic non-communicable diseases (NCDs), such as cardiovascular diseases and type 2 diabetes (T2D) [3, 4].

The term “inflammaging” is related to systemic, chronic, and low-grade inflammation that occurs in the absence of infection, mainly caused by endogenous signs, which occurs with aging [5]. Inflammaging is characterized by a progressive loss of physiological integrity, which may lead to impairment of function and greater vulnerability to death [6, 7], comprising a major risk factor for NCDs [7]. The most common NCDs in long-lived individuals are systemic arterial hypertension, T2D, and metabolic syndrome (MetS) [8–10]. Furthermore, it has been observed that leptin concentration increases in older adults since their fat mass is higher when compared to younger individuals due to low energy expenditure combined with a poor diet [11]. Besides that, it has been hypothesized that aging decreases leptin responsiveness due to impaired hypothalamic leptin receptor signaling [11].

Studies have shown that individuals with MetS have shown high levels of leptin, which can be explained by the decreased sensitivity to elevated leptin levels (leptin resistance), caused by defects of the leptin receptor, induction of inhibitors of leptin signaling, and alterations in the transport of leptin across the blood–brain barrier [12, 13]. Furthermore, high leptin levels can be an adipose tissue-derived mediator for the development of systemic arterial hypertension, as hyperleptinemia was found to be associated with elevated systolic and diastolic blood pressure [14].

In this sense, circulating microRNAs (miRNAs) have been investigated as potential biomarkers for NCDs, as they present distinct expression patterns in different clinical conditions [15–18]. MiRNAs are small non-coding single-stranded RNA molecules, ranging from 18 to 25 nucleotides involved in cellular and genomic regulation since they can inhibit the translation step of proteins through interaction with messenger RNA in the 3' region UTR [15, 19]. These small molecules may be identified in tissues and various body fluids, such as blood [20].

Thus, the present study aimed to assess the expression profile of 21 miRNAs and their associations with

inflammatory biomarkers in older adults living in São Paulo municipality, Brazil, who participated in ISA-Nutrition, a population-based study.

METHODS

Study Design and Participants

This cross-sectional population-based study evaluated a subsample of 200 older adults (≥ 60 years old) within the São Paulo Health Survey with a focus on nutrition (ISA-Nutrition 2015). Data were collected from February 2015 to February 2016 in São Paulo city, and further details on sample selection have been previously published [21].

The subsample was selected according to the following exclusion criteria: plasma samples that indicated the presence of hemolysis and/or insufficient volume, the presence of acute inflammatory diseases, cancer, and the use of drugs that could interfere with the markers of interest (antibiotics, anti-inflammatory, immunomodulatory, and antiretroviral). In addition, only individuals with complete data for anthropometric variables, systemic blood pressure, and glycemic and lipid profile biomarkers were selected.

The study was approved by the Research Ethics Committee of the School of Public Health of the University of São Paulo (# 49221121.4.0000.5421 and # 30848914.7.0000.5421 for Isa-Nutrition). Written informed consent was obtained from all the participants.

Clinical and Biochemical Analysis

Data collection on weight, height, and waist circumference was performed according to standardized protocols. The mean weight and height values of each individual in the study were used to calculate body mass index (BMI), defined as body mass in kilograms divided by the square of height in meters (kg/m^2). BMI values were used to classify the individual's anthropometric nutritional status according to the criteria proposed in the standards published by the Pan American Health Organization [22]. Waist circumference (WC) was used for the diagnosis of central obesity according to the criteria defined by the WHO: ≥ 102 cm for men and ≥ 88 cm for women [23]. Blood pressure was measured in triplicate in the right arm using an automatic device (Omron model HEM-712C, Omron HealthCare, Inc., Kyoto, Japan). In addition, individuals were evaluated for the presence of MetS according to criteria defined by the International Diabetes Federation (2006) [24].

Plasma miRNAs Are Associated With Inflammation in Older Adults

Approximately 30 mL of fasting blood was collected from participants (12–14 h) through venipuncture with the aid of sterile and disposable syringes by specialized professionals at the participants' homes, according to prior appointments. Participants were instructed not to consume alcoholic beverages 72 h before blood collection and to avoid intense physical exercise the day before and on the day of blood collection.

Plasma concentrations of IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), intercellular 1 (sICAM-1), and vascular 1 (sVCAM-1) soluble adhesion molecules, adiponectin, and leptin were determined using a multiplex immunoassay kit (Milliplex, Merck Millipore, MA, USA). Plasma C-reactive protein (CRP) quantification was performed through ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kit (Cat. No. HEA821Hu; Cloud-Clone Corp., Houston, TX, USA).

The homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) was calculated from fasting glucose and insulin as [fasting glucose (mg/dL) \times fasting plasma insulin (μ U/mL)/405]. The cutoff point adopted for HOMA-IR was 2.71, as proposed by Geloneze et al. [25], and validated for the Brazilian population.

miRNA Expression

The expression of 21 miRNAs (miR-15a-5p, miR-16-5p, miR-21-5p, miR-28-3p, miR-30a-5p, miR-30d-5p, miR-122-5p, miR-126-3p, miR-130b-3p, miR-139-3p, miR-140-5p, miR-146a-5p, miR-150-5p, miR-222-3p, miR-223-3p, miR-363-3p, miR-375-3p, miR-376a-3p, miR-486-5p, miR-532-5p, miR-let-7c-5p) was analyzed in aliquots of plasma, using real-time qPCR with BioMark™ 96.96 Fluidigm Dynamic Array (PJ1910334). All samples were controlled for hemolysis by measurement of free hemoglobin at 414 nm using a NanoQuant plate in a TECAN (Männedorf, Switzerland) spectrophotometer.

RNA was extracted from 300 μ L plasma using Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA Purification Kit (Slurry Format) (Norgen®, Thorold, ON, Canada, Cat. 42,800). All the samples were spiked with cel-miR-39-3p at 2.7⁻⁴ μ M (IDT). RNA was eluted in 80 μ L elution buffer. The reverse transcription was performed with 15 μ L of RNA eluted solution using miRCURY LNA RT kit (Cat.339340, Qiagen-France), as described by the supplier's instructions. All reactions were spiked

using UniSP6 (part of Spike-in kit Cat.339390, Qiagen-France, Coutaboeuf).

Pre-amplification was performed using miRCURY LNA miRNA PCR Assay primers (Cat.339306; Qiagen-France, Coutaboeuf) for the 21 miRNAs of interest plus RT Spike-in UniSp6 and Extraction Spike-in Cel-miR-39. The reverse transcription product was purified using exonuclease I (Cat. M0293; New England Biolabs France, Evry) and diluted at a ratio of 1:10. Then, 1.25 μ L of diluted cDNA was pre-amplified using Fluidigm PreAmp Master mix (Cat 100-5580, Les Ulis-France), and primers mix in a 5 μ L reaction volume according to the supplier's specifications.

For each assay, qPCR was performed in triplicate from 1.5 μ L of diluted pre-amplification product (1:10) using Biotium Fast Probe Master Mix (Cat.310005, Fremont, CA) in dynamic arrays 96 \times 96 IFC (Cat. BMK-M-96.96) on Biomark™ (Fluidigm, Les Ulis-France), according to the supplier's protocol.

Raw Ct values greater than 40 were considered undetectable. The DCt method was used to calculate relative expression values. The first normalization step adjusted the raw Ct values to the recovered levels of spike-in cel-miR-39 and Spike-in UniSp6. The second normalization step subtracted the normalized Ct for individual samples from the mean of all individual assays for each miRNA. The fold-change values calculated from the normalized DCt data were used for statistical analysis.

Systemic Low-grade Inflammation Score (SIS)

The SIS was calculated from the plasma concentration of 10 inflammatory biomarkers (CRP, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , MCP-1, PAI-1, sICAM-1, sVCAM-1, and adiponectin) [26], based on the methodology proposed by Tabung et al. [27]. This score was calculated from the sum of these inflammatory biomarkers values, which were transformed to logarithm on the neperian basis and standardized in Z-score, assigning a negative charge to biomarkers with anti-inflammatory action (adiponectin and IL-10).

The SIS assesses the low-grade inflammation of individuals, ranging from a maximally anti-inflammatory to maximally proinflammatory, with higher (more positive) scores indicating more proinflammatory state and lower (more negative) scores indicating more anti-inflammatory state. Thereby, the SIS was calculated using the following equation:

$$\begin{aligned}
SIS = & Z\text{-score}(\log_{10} CRP) + Z\text{-score}(\log_{10} IL-6) \\
& + Z\text{-score}(\log_{10} IL-1\beta) \\
& + Z\text{-score}(\log_{10} TNF-\alpha) \\
& + Z\text{-score}(\log_{10} PAI-1) \\
& + Z\text{-score}(\log_{10} MCP-1) \\
& + Z\text{-score}(\log_{10} sICAM-1) \\
& + Z\text{-score}(\log_{10} sVCAM-1) \\
& - Z\text{-score}(\log_{10} adiponectin) \\
& - Z\text{-score}(\log_{10} IL-10)
\end{aligned}$$

Bioinformatics Analysis

The bioinformatics software TargetScan (<http://www.targetscan.org>) was used to identify potential targets of miR-15a, miR-16, miR-130b, miR-139, miR-363, miR-486, and miR-532.

Statistical Analysis

Descriptive statistics, including proportions, means, and standard errors, were calculated and analyzed to obtain a comprehensive overview of the data. The Wilcoxon-Mann-Whitney test [28] was employed to assess significant differences in SIS among groups divided according to sex and the presence of MetS.

Spearman's correlation coefficient was used to estimate the correlation between plasma miRNA expression and lipid, glycemic, and anthropometric variables. Confidence intervals were also calculated using the complex survey design to ensure representativeness at the population level.

Furthermore, we have adopted generalized linear models (GLMs) to examine complex relationships between variables, such as the effect of multiple covariates while accounting for the non-normal distribution of some variables [29], providing a more comprehensive understanding of the factors that may influence the observed associations between plasma miRNA expression and lipid, glycemic, and anthropometric variables.

Three distinct probability distributions – normal, gamma, and inverse Gaussian – were compared using different link functions in a GLM model. The Akaike Information Criterion (AIC) was employed as the criterion for comparison, with a lower AIC score indicating a better fit to the data [30, 31]. Coefficients, along with

a 95% confidence interval, were applied to estimate the impact of covariates, and the statistical significance of the covariates was determined using the Wald test [32]. The analysis was conducted using R software version 4.2.3 [33] and the survey package [34], with a significance level set at $p < 0.05$.

RESULTS

The final sample size was 193 individuals, after excluding four individuals due to hemolyzed blood samples, two individuals with PCR assay inhibition, and one participant identified as an outlier (Fig. 1).

Of the sample, 50.4% were women, and the average age was 69.1 (0.5) years. Furthermore, 45.2% of the participants were overweight or obese, 64.7% had previously been diagnosed with MetS, and 50.9% exhibited insulin resistance. The study also measured various biomarkers, including HOMA1-IR, leptin, and different miRNAs, with the average value for each biomarker and its standard error provided in Table 1.

The sample had a high prevalence of overweight/obesity, insulin resistance, and MetS. We also observed differences in plasma concentrations of leptin based on SIS. We explored the potential relationship between SIS and leptin concentration with the other characteristics of individuals' in the sample (Table 2).

Table 2 displays the results indicating that individuals without MetS had significantly lower SIS levels compared to those with MetS. In addition, a positive correlation was identified between SIS and several metabolic risk factors, including BMI, waist circumference, HOMA1-IR, and leptin concentrations. Conversely, two miRNAs, miR-16 and miR-363, demonstrated a negative correlation with SIS.

Lower leptin concentrations were observed in men and participants without MetS compared to women and those with MetS, respectively. We observed significant positive correlations between leptin concentrations and metabolic risk factors such as BMI, waist circumference, and HOMA1-IR. Furthermore, we identified several miRNAs that were negatively correlated with leptin levels, including miR-16, miR-21, miR-28, miR-30d, miR-126, miR-130b, miR-140, miR-146a, miR-222, miR-223, miR-363, miR-375, miR-486, and miR-532. Only miR-15a was positively correlated with leptin levels.

Plasma MiRNAs Are Associated With Inflammation in Older Adults

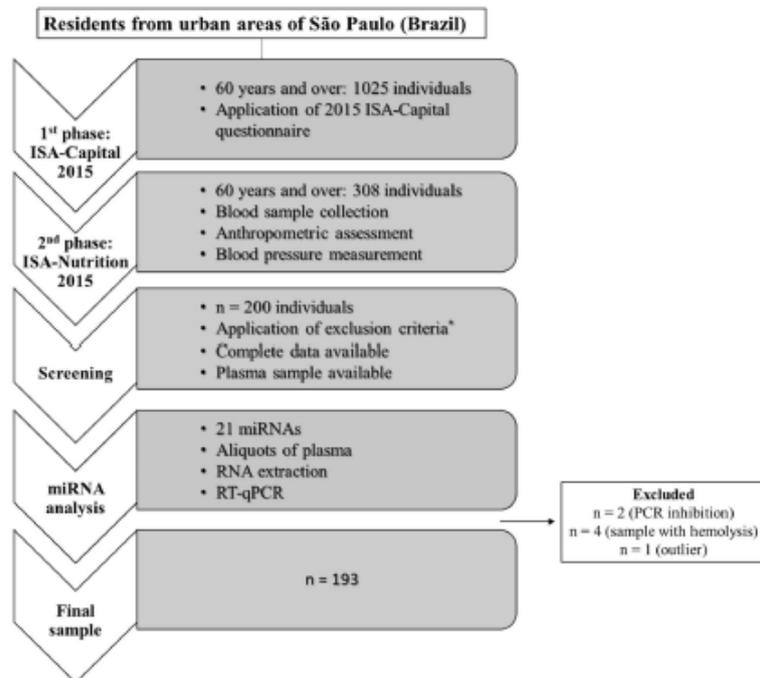


Fig. 1 Stages of study sample selection. Created with BioRender.com. Legend: *Exclusion criteria: presence of acute inflammatory diseases, cancer, and the use of medication (antibiotics, anti-inflammatory drugs, immunomodulators, antiretrovirals) that could interfere with the markers of interest, chronic alcoholism, use of enteral/parenteral diet, and pregnancy/lactation. Adapted from: Fisberg, R.M., Sales, C.H., Fontanelli, M.M., Pereira, J. L., Alves, M.C.G.P., Escuder, M.M.L., César, C.L.G., and Goldbaum, M. 2018. 2015 Health Survey of São Paulo with a focus on Nutrition: Rationale, design, and procedures. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu10020169>.

Regression Models

In order to investigate the relationships between miRNA expression, significant SIS, and leptin levels in our sample, we used generalized linear models (GLMs). We specifically chose miRNAs that displayed significant Spearman correlation coefficients with our variables of interest. Our findings are summarized in Fig. 2 and Table 3, which includes only those GLMs that yielded significant models.

The first model used miR-15a expression as the response variable and included leptin concentrations as a predictor variable with a Gamma distribution and an

identity link function. The coefficient for the intercept was 1.2429, and for leptin, it was -0.0269.

The second model used miR-16 expression as the response variable and included two predictor variables: SIS and leptin. The distribution for miR-16 was Inverse Gaussian, and the link function was a log. The coefficient for the intercept, SIS, leptin, and the interaction between both variables (SIS: Leptin) were 0.5014, -0.0563, -0.0477, and 0.0081, respectively.

The third model in Table 3 used miR-21 expression as the response variable, including SIS and leptin. The distribution for miR-21 was Inverse Gaussian, and the link function was the inverse function. The coefficient

Table 1 Characterization of the subsample of 193 older adults participating in ISA-Nutrition population-based study

Variables	n (%) / mean \pm SE
Sex, n (%)	
Male	92 (49.6%)
Female	101 (50.4%)
Age (years)	69.1 \pm 0.5
BMI (kg/m ²)	27.5 \pm 0.4
Overweight/Obese, n (%)	86 (45.2%)
Waist circumference (cm)	99.7 \pm 1.3
SBP (mmHg)	138.2 \pm 1.4
DBP (mmHg)	76.2 \pm 0.7
Presence of MetS, n (%)	126 (64.7%)
HOMA1-IR	3.8 \pm 0.3
Insulin resistance, n (%)	103 (50.9%)
Leptin (ng/mL)	4.2 \pm 0.4
miR-15a	1.1 \pm 0.1
miR-16	1.4 \pm 0.1
miR-21	1.2 \pm 0.1
miR-28	1.6 \pm 0.2
miR-30a	1.1 \pm 0.1
miR-30d	1.2 \pm 0.1
miR-122	1.8 \pm 0.3
miR-126	1.2 \pm 0.1
miR-130b	1.4 \pm 0.1
miR-139	1.2 \pm 0.1
miR-140	1.3 \pm 0.1
miR-146a	1.4 \pm 0.1
miR-150	1.1 \pm 0.1
miR-222	1.3 \pm 0.1
miR-223	1.7 \pm 0.2
miR-363	1.2 \pm 0.1
miR-375	1.2 \pm 0.1
miR-376a	1.6 \pm 0.1
miR-486	1.2 \pm 0.1
miR-532	1.4 \pm 0.1
miR-let7c	1.2 \pm 0.1

Data presented in absolute and relative frequencies (n, %) and mean (standard error, SE)

BMI body mass index, SBP systolic blood pressure, DBP diastolic blood pressure, MetS metabolic syndrome, HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance

for the intercept was 0.7806, for the SIS was 0.0293, for leptin was 0.0280, and -0.0081 for the interaction between SIS and leptin.

The fourth model examined the relationship between miR-223 expression and leptin as a predictor variable. The distributional assumption for miR-223 expression was the inverse Gaussian with a logarithmic link function. The coefficients for the intercept and leptin were equal to 0.6990 and -0.0487, respectively.

The fifth model described the relationship between miR-363 expression and leptin as a predictor variable. The distributional assumption for miR-363 expression was the Inverse Gaussian with an identity link function. The coefficients for the intercept and leptin were 1.3983 and -0.0385, respectively.

The last model in Table 3 reported the relationship between plasma miR-532 expression and leptin concentrations as the predictor variable. The link function for the model was inverse Gaussian with an identity link. The respective coefficients for the intercept and leptin were 1.6197 and -0.0541, respectively.

Explaining the Estimated GLMs

The GLM analysis of miR-15a expression indicates that an increase of 1 ng/mL in leptin is associated with a decrease of 0.0269 in the expected value of plasma miR-15a expression. The GLM for miR-16 used the logarithmic function as the link function, and therefore, the coefficients should be transformed using the function $f(x) = 100 * (\exp(x) - 1)$ and interpreted as percentage changes in the expected value of miR-16 expression. Based on this model, we expect a 5.63% decrease in miR-16 expression for every 1 unit increase in SIS and a 4.77% decrease for every 1 ng/mL increase in leptin. Furthermore, the effect of leptin on plasma miR-16 expression depends on the value of SIS, with an expected increase of 0.81% in the effect of leptin for each 1 unit increase in SIS.

The inverse link function was employed in the GLM used for analyzing the relationship between plasma miR-21 expression and SIS and leptin concentrations. This means that a unit increase in SIS is associated with an increase of 2.93% in miR-21 expression. Interestingly, the interaction term between SIS and leptin was negative (-0.0081), indicating that the positive association between SIS and miR-21 expression weakens as the concentrations of leptin increase.

The model used to analyze plasma miR-223 expression employed the log link function. The results indicated that an increase of 1 ng/mL in leptin concentrations is associated with a decrease of 4.87% in the expected

Plasma MiRNAs Are Associated With Inflammation in Older Adults

Table 2 Association between systemic low-grade inflammation score (SIS) and leptin biomarker with health characteristics in 193 older adults participating in the ISA-Nutrition population-based study

Variables	Systemic low-grade inflammatory score (SIS)		Leptin (ng/mL)	
	mean \pm SE	p-value	mean \pm SE	p-value
Sex				
Male	-0.4046 \pm 0.3920	0.0773	1.2348 \pm 0.2276	< 0.0001 ^a
Female	0.4950 \pm 0.3400		7.0166 \pm 0.5414	
Presence of MetS				
No	-0.7517 \pm 0.4922	0.0230^a	3.3378 \pm 0.5785	0.04955^a
Yes	0.4868 \pm 0.3126		4.5956 \pm 0.4741	
Variables	correlation	p-value	correlation	p-value
Age (years)	0.1312	0.0689	-0.0679	0.3484
BMI (kg/m ²)	0.2081	0.0037^b	0.5046	< 0.0001 ^b
Waist circumference (cm)	0.2024	0.0048^b	0.3185	< 0.0001 ^b
SBP (mmHg)	-0.0230	0.7510	-0.0552	0.4459
DBP (mmHg)	0.0441	0.5424	0.0493	0.4957
HOMA1-IR	0.4339	< 0.001 ^b	0.3511	< 0.0001 ^b
Leptin (ng/mL)	0.3078	< 0.001 ^b	-	-
miR-15a	-0.1180	0.1022	0.2669	0.0002^b
miR-16	-0.1506	0.0366^b	-0.2922	< 0.0001 ^b
miR-21	-0.0391	0.5889	-0.2216	0.0020^b
miR-28	-0.0985	0.1740	-0.1448	0.0446^b
miR-30a	-0.0399	0.5818	-0.1361	0.0592
miR-30d	-0.0651	0.3686	-0.1963	0.0062^b
miR-122	0.0110	0.8790	-0.0786	0.2774
miR-126	0.0184	0.7991	-0.1767	0.0139^b
miR-130b	-0.1116	0.1294	-0.1614	0.0249^b
miR-139	0.0791	0.4138	-0.0275	0.7038
miR-140	0.0018	0.9803	-0.1708	0.0176^b
miR-146a	-0.0172	0.8128	-0.1431	0.0471^b
miR-150	-0.0070	0.9230	0.0055	0.9393
miR-222	-0.1062	0.1417	-0.1871	0.0092^b
miR-223	-0.0743	0.3047	-0.1742	0.0154^b
miR-363	-0.1519	0.0350^b	-0.2834	< 0.0001 ^b
miR-375	-0.1220	0.0926	-0.1616	0.0255^b
miR-376a	-0.0637	0.3788	-0.1294	0.0730
miR-486	-0.1001	0.1662	-0.2277	0.0014^b
miR-532	-0.1213	0.0964	-0.2464	0.0006^b
miR-let7c	0.0504	0.4865	-0.1037	0.1511

^aSignificant difference in the Wilcoxon-Mann-Whitney test (p-value < 0.05). ^bSignificant Spearman's correlation coefficient (p-value < 0.05)

value of miR-223 expression. For the models analyzing miR-363 and miR-532 expression, the identity link function was used. The coefficient for Leptin in the miR-363 model suggests that the expected value of miR-363

decreases by 0.0385 for every 1 ng/mL increase in Leptin levels. Similarly, the miR-532 model indicates that a 1 ng/mL increase in Leptin is associated with a 0.0541 decrease in the expected value of miR-532 expression.

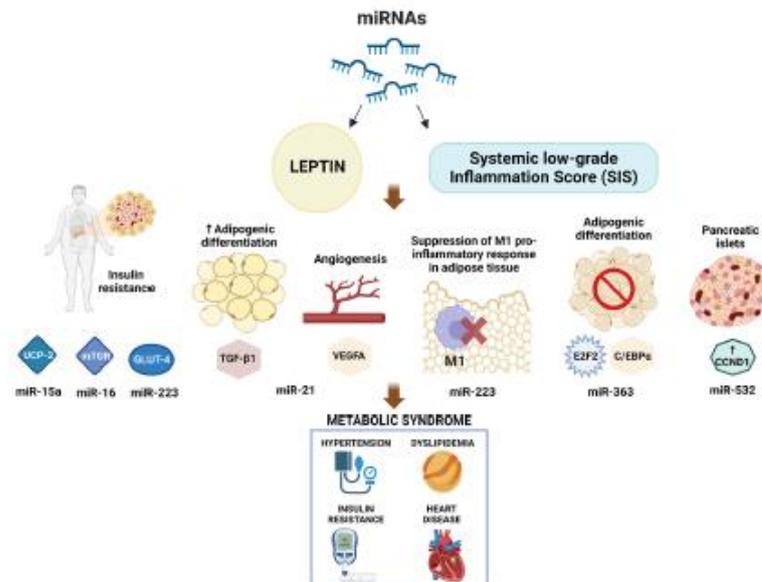


Fig. 2 How microRNAs and their relationships with leptin levels and Systemic low-grade Inflammation (SIS) values can impact the development of metabolic syndrome in older adults. Created with BioRender.com. Legend: UCP-2, uncoupling protein-2; mTOR, mammalian target of rapamycin; GLUT-4, glucose transporter type 4; TGF- β 1, transforming growth factor beta; VEGFA, vascular endothelial growth factor A; M1, macrophage M1; E2F2, E2F transcription factor 2; C/EBPs, CCAAT-enhancer-binding proteins; CCND1, Cyclin D1.

In addition to the GLM results, we predicted the potential biological targets of miRNAs with significant results related to leptin levels and SIS in GLM (miR-15a, miR-16, miR-21, miR-223, miR-363, and miR-532) (Table 4).

DISCUSSION

The results obtained in this study show that the older adults in the subsample presented high values of waist circumference and percentage of overweight/obesity, insulin resistance, and MetS. In addition, individuals with higher SIS values had higher leptin concentrations, as well as older adults with MetS had higher SIS values compared to those without MetS. It should be noted that the plasma expression of 15 miRNAs

correlated with SIS values and leptin concentrations. It should be noted that.

MetS is characterized by a combination of factors that may increase the risk of cardiovascular events, type 2 diabetes, and other clinical conditions [24], and its pathophysiology is characterized by the presence of a systemic inflammatory process [3, 4, 26, 35]. Systemic and low-grade inflammation is characterized by elevated circulating concentrations of acute-phase proteins and inflammatory cytokines, such as C-reactive protein, TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-17, and macrophage and T lymphocyte infiltration in insulin-dependent tissues [1, 2, 35]. Furthermore, the presence of obesity may increase the expression of these inflammatory cytokines, in addition to being related to the activation of several signaling pathways involved in the pathogenesis of insulin resistance and several metabolic diseases [3].

Plasma MiRNAs Are Associated With Inflammation in Older Adults

Table 3 Generalized linear models (GLM) results for miRNA expression with leptin levels and systemic low-grade inflammation score (SIS)

miRNA	Distribution (link function)	Variable	Coefficient	CI	p-value
miR-15a	Gamma (identity)	Intercept	1.2429	[1.0954, 1.3905]	<0.0001
		Leptin	-0.0269	[-0.0529, -0.0009]	0.0429
miR-16	Inverse Gaussian (log)	Intercept	0.5014	[0.2975, 0.7053]	<0.0001
		SIS	-0.0563	[-0.0987, -0.0139]	0.0099
		Leptin	-0.0477	[-0.0840, -0.0114]	0.0106
		SIS:Leptin*	0.0081	[0.0013, 0.0149]	0.0198
miR-21	Inverse Gaussian (inverse)	Intercept	0.7806	[0.6500, 0.9112]	<0.0001
		SIS	0.0293	[0.0004, 0.0582]	0.0471
		Leptin	0.0280	[-0.0019, 0.0579]	0.0660
		SIS:Leptin*	-0.0081	[-0.0146, -0.0016]	0.0160
miR-223	Inverse Gaussian (log)	Intercept	0.6990	[0.3960, 1.0020]	<0.0001
		Leptin	-0.0487	[-0.0940, -0.0033]	0.0357
miR-363	Inverse Gaussian (identity)	Intercept	1.3983	[1.1769, 1.6197]	<0.0001
		Leptin	-0.0385	[-0.0701, -0.0069]	0.0177
miR-532	Inverse Gaussian (identity)	Intercept	1.6197	[1.2951, 1.9443]	<0.0001
		Leptin	-0.0541	[-0.0913, -0.0169]	0.0049

*Interaction between SIS and Leptin

Variables of sex and presence of metabolic syndrome were not significant in GLM

In addition, high leptin concentrations were observed in older adults with higher SIS values. Leptin is a hormone that acts in adiposity signaling, as well as is crucial in regulating food intake and energy expenditure, inducing anorexia and increased metabolic rate [36, 37]. However, a previous study showed that sensitivity to this hormone decreases with age-related body fat gain [38]. Thus, such body fat gain brings a progressive condition of peripheral and central resistance to leptin, demonstrated by the increase in serum concentration [35, 36].

Furthermore, leptin concentrations were higher in individuals with MetS than in those without MetS, and when observed according to gender, women had higher leptin concentrations than men. A study carried out in the Swedish population, including 95 individuals of both sexes, obese (BMI > 27 kg/m²) and non-obese showed that women had a higher percentage of body fat and a higher serum concentration of leptin than men [39]. These significant differences remained when only obese individuals were evaluated [39]. Furthermore, when evaluating leptin secretion by adipose tissue, according to the presence or absence of obesity, it was observed that obese women had significantly higher leptin secretion compared to obese men [39].

This fact stems from the different patterns of fat deposition in women [40, 41], in addition to the influence of sex hormones [42–44].

In addition, the results obtained in this study showed that the plasma expression of 15 miRNAs (miR-15a, miR-16, miR-21, miR-28, miR-30d, miR-126, miR-130b, miR-140, miR-146a, miR-222, miR-223, miR-363, miR-375, miR-486 and miR-532) correlated with SIS and leptin concentrations. In order to further investigate these relationships, GLMs were tested, which showed significant results for six (miR-15a, miR-16, miR-21, miR-223, miR-363, and miR-532) of the 15 miRNAs mentioned above.

In the present study, miR-15a expression was negatively associated with leptin concentrations. It should be noted that hyperleptinemia is a common link to obesity and insulin resistance, and obesity triggers increased concentrations of leptin, which acts as a pro-inflammatory cytokine that amplifies the process of insulin resistance [45, 46]. In this sense, miR-15a has acted in the positive regulation of insulin biosynthesis by inhibiting uncoupling protein 2 (UCP2) – a protein with an important role in insulin resistance – increasing

Table 4 Potential biological targets for miRNAs miR-15a, miR-16, miR-21, miR-223, miR-363 and miR-532

miRNA	Potential target	Function
miR-15a	VEGFA	This gene is a member of the PDGF/VEGF growth factor family. It encodes a heparin-binding protein, which exists as a disulfide-linked homodimer. This growth factor induces the proliferation and migration of vascular endothelial cells and is essential for both physiological and pathological angiogenesis
	UCP2	Mitochondrial uncoupling proteins (UCP) are members of the larger family of mitochondrial anion carrier proteins. UCPS separate oxidative phosphorylation from ATP synthesis with energy dissipated as heat, also referred to as the mitochondrial proton leak. This gene is expressed in many tissues, with the greatest expression in skeletal muscle. It is thought to play a role in nonshivering thermogenesis, obesity, and diabetes
miR-16	IGF1	The protein encoded by this gene is similar to insulin in function and structure and is a member of a family of proteins involved in mediating growth and development. The encoded protein is processed from a precursor, bound by a specific receptor, and secreted. Defects in this gene are a cause of insulin-like growth factor I deficiency
	INSR	This gene encodes a member of the receptor tyrosine kinase family of proteins. The encoded preproprotein is proteolytically processed to generate alpha and beta subunits that form a heterotetrameric receptor. The binding of insulin or other ligands to this receptor activates the insulin signaling pathway, which regulates glucose uptake and release, as well as the synthesis and storage of carbohydrates, lipids, and protein
	IRS1	This gene encodes a protein that is phosphorylated by insulin receptor tyrosine kinase. Mutations in this gene are associated with type 2 diabetes and susceptibility to insulin resistance
miR-21	TGF- β 1	This gene encodes a ligand of the TGF-beta (transforming growth factor-beta) superfamily of proteins. This encoded protein regulates cell proliferation, differentiation, and growth and can modulate the expression and activation of other growth factors, including interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha
	VEGFA	See above
miR-223	SLC2A4	This gene is a member of the solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) family and encodes a protein that functions as an insulin-regulated facilitative glucose transporter (GLUT4)
	IRS1	See above
miR-363	LEP	This gene encodes a protein secreted by white adipocytes into the circulation and plays a major role in regulating energy homeostasis. Circulating leptin binds to the leptin receptor in the brain, which activates downstream signaling pathways that inhibit feeding and promote energy expenditure. This protein also has several endocrine functions and is involved in regulating immune and inflammatory responses, hematopoiesis, angiogenesis, reproduction, bone formation, and wound healing
	C/EBP α	This intronless gene encodes a transcription factor that contains a basic leucine zipper (bZIP) domain and recognizes the CCAAT motif in the promoters of target genes. The encoded protein functions in homodimers and heterodimers with CCAAT/enhancer-binding proteins beta and gamma. The activity of this protein can modulate the expression of genes involved in cell cycle regulation and body weight homeostasis
	E2F2	The protein encoded by this gene is a member of the E2F family of transcription factors. The E2F family plays a crucial role in controlling the cell cycle and action of tumor suppressor proteins and is also a target of the transforming proteins of small DNA tumor viruses
miR-532	CCND1	The protein encoded by this gene belongs to the highly conserved cyclin family. Cyclins function as regulators of CDK kinases. Different cyclins exhibit distinct expression and degradation patterns contributing to each mitotic event's temporal coordination. This cyclin forms a complex with and functions as a regulatory subunit of CDK4 or CDK6, whose activity is required for cell cycle G1/S transition
	IRS2	This gene encodes the insulin receptor substrate 2, a cytoplasmic signaling molecule that mediates the effects of insulin, insulin-like growth factor 1, and other cytokines by acting as a molecular adaptor between diverse receptor tyrosine kinases and downstream effectors. The product of this gene is phosphorylated by the insulin receptor tyrosine kinase upon receptor stimulation
	LEP	See above

VEGFA Vascular Endothelial Growth Factor A, UCP2 Uncoupling protein-2, IGF1 Insulin Like Growth Factor 1, INSR Insulin Receptor, IRS1 Insulin Receptor Substrate 1, TGF- β 1 Transforming Growth Factor Beta 1, SLC2A4 Solute Carrier Family 2 Member 4, LEP Leptin, C/EBP α CCAAT/enhancer-binding protein alpha, E2F2 E2F Transcription Factor 2, CCND1 Cyclin D1, IRS2 Insulin Receptor Substrate 2

Plasma miRNAs Are Associated With Inflammation in Older Adults

the intracellular concentration of ATP in the islets and favoring insulin secretion glucose-induced [47, 48].

Regarding miR-16, it correlated negatively with SIS and leptin concentrations, and when tested in GLM, it was observed that the reduction in its expression was expected with each increase of 1 unit in SIS and 1 ng/mL in leptin concentration. Similar to miR-15a, studies have shown the action of miR-16 regarding insulin sensitivity [49, 50]. A study carried out with American individuals showed a positive association between the plasma expression of miR-16 and the glucose disposal rate, thus indicating that the greater the expression of miR-16, the greater the sensitivity to the action of insulin in the evaluated individuals [49]. Similar results were observed in a study with rats, which showed a reduction of miR-16 in insulin-resistant skeletal muscle [50]. This study also showed that miR-16 helps control protein synthesis stimulated by insulin in skeletal muscle by regulating the mTOR protein [50]. Considering that miR-16 has several target genes that are related to insulin signaling, the results of the present study show the important role of this miRNA in the condition of insulin resistance [49, 50], which is characterized by low-grade systemic inflammation [3].

Systemic and low-grade inflammation may be actively regulated by miRNAs, which can act as epigenetic regulators affecting adipogenesis, adipocyte differentiation, lipid metabolism, white adipose tissue browning, glucose homeostasis, and insulin resistance, thereby may influence the development and progression of obesity and other NCDs [51]. The present study observed that the increase in SIS was associated with increased expression of miR-21, which has been upregulated in several diseases, such as obesity and type 2 diabetes [52, 53]. A study carried out with rats showed that miR-21 was upregulated in the white adipose tissue of the epididymis of obese rats compared to non-obese ones [53], whilst a study carried out in humans showed a greater expression of miR-21 in the subcutaneous adipose tissue of obese people with type 2 diabetes when compared to those obese individuals without type 2 diabetes [54]. The miR-21 is related to the increase in adipogenic differentiation through modulation of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) signaling [55], in addition to playing a crucial role in angiogenesis, through the regulation of VEGFA, known to be a regulator of thermogenesis [56]. Both growth above factors are potential targets of miR-21, thus indicating a crucial role for this miRNA in obesity, type 2 diabetes, and insulin resistance [57].

Plasma expression of miR-223 was negatively correlated with leptin concentrations in the individuals evaluated in this study. miR-223 controls the polarization of macrophages, changing their phenotypes and modulating the secretion of inflammatory molecules in adipose tissue [51, 58]. Thus, the anti-inflammatory mechanism described for miR-223 is the suppression of the classic pro-inflammatory response of M1 macrophages in adipose tissue [58]. A study carried out with humans aged 40 to 60 years showed that the plasma expression of miR-223 was lower in overweight and obese individuals than in those with adequate weight [59]. In addition, genes related to glucose metabolism, such as IRS1 and GLUT4, were found as potential targets of miR-223, and miR-223 modulates GLUT4 expression. The deregulation in the expression of this miRNA can inhibit the signaling cascade of insulin, which can result in insulin resistance and type 2 diabetes [60, 61].

In the present study, miR-363 was negatively correlated with SIS and leptin concentration, and this negative association with leptin was also seen in GLM. miR-363 inhibits adipocyte differentiation through the E2F Transcription Factor 2 (E2F2) target gene and the concomitant downregulation of CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP α) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) [62]. C/EBP α , which plays a role in the differentiation of preadipocytes into mature adipocytes, has been shown to modify leptin gene expression, playing a central role in body weight homeostasis [63]. In turn, C/EBP α activates the PPAR γ gene, promoting adipogenesis [64]. Thus, C/EBP α and PPAR γ promote the expression of genes involved in insulin sensitivity, lipogenesis, and lipolysis [65].

Finally, miR-532 expression was negatively correlated with leptin concentrations. A study carried out with men with a mean age of 50 years showed lower plasma expression of miR-532 in the obese group compared to the non-obese group [66]. One potential target gene for miR-532 was the cyclin D1 gene (CCND1), a member of the cyclin family and cyclin-dependent kinase regulator [67]. CCND1 expression is upregulated in diabetic islets [68], and this gene has been associated with fatty acid and glucose metabolic pathways and may be involved in developing obesity-related type 2 diabetes [66, 69].

The main limitation of the study refers to adopting a bioinformatics tool to predict the main target genes for each miRNA, considering the absence of direct measures. In addition, this study's cross-sectional design is also considered a limitation, as it is not possible to infer

causality from the observed results. However, the present study used a considerable sample size, being representative of the population of the São Paulo municipality, the largest city in Brazil; thus, the results comprise robust evidence on the connections between circulating miRNA, low-grade systemic inflammation, and leptin levels in older adults. Furthermore, individuals with inflammatory diseases and cancer, and those with blood samples with hemolysis were not included in this study, thus minimizing the influence of these factors on the results obtained. In addition, the evaluation of the plasma expression of 21 miRNAs in the context of NCDs is considered one of the differentials of this study since Brazilian studies within this context are still scarce in the literature.

CONCLUSION

Older adults diagnosed with MetS had higher concentrations of leptin and higher values related to SIS, suggesting peripheral resistance to leptin, which is closely associated with the occurrence of systemic, chronic, and low-grade inflammation. Besides, plasma expression of six miRNAs (miR-15a, miR-16, miR-21, miR-223, miR-363, and miR-532) was associated with leptin and SIS values, suggesting a potential role of these miRNAs as biomarkers of cardiometabolic risk in older adults.

ACKNOWLEDGEMENTS

This paper was supported by the São Paulo Research Foundation – FAPESP (Grant 2020/03104–5 | Grant 2019/22934–1 | Grant 2017/05125–7); National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (Grant 150834/2020–9). The funding agencies' had no role in the study design, collection, analysis, interpretation of data, writing of the report, or decision to submit the article for publication.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: [Gabrielli Barbosa de Carvalho], [Marcelo Macedo Rogero]; Methodology: [Gabrielli Barbosa de Carvalho], [Marcelo Macedo Rogero]; Formal analysis and investigation: [Gabrielli Barbosa de Carvalho], [Flávia Mori Sarti], [Sdraque Enêas de Figueirêdo Lucena]; Writing – original draft preparation: [Gabrielli Barbosa de Carvalho]; Writing – review and editing: [Paula Nascimento Brandão-Lima], [Tanyara Baliani Payolla], [Sdraque Enêas de Figueirêdo Lucena], [Flávia Mori Sarti], [Regina Mara Fisberg], [Marcelo Macedo Rogero]. All authors have read and approved the version of the paper.

FUNDING

This paper was supported by the São Paulo Research Foundation—FAPESP (Grant 2020/03104–5 | Grant 2019/22934–1); National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (Grant 150834/2020–9). The sponsors had no role in the study design, collection, analysis, interpretation of data, writing of the report, or decision to submit the article for publication.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

Not applicable.

DECLARATIONS

Ethics Approval This study was approved by the Research Ethics Committee of the School of Public Health of the University of São Paulo (# 49221121.4.0000.5421 and # 30848914.7.0000.5421 for Isa-Nutrition). Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Competing Interests The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

REFERENCES

1. Van Greevenbroek, M.M., C.G. Schalkwijk, and C.D. Stehouwer. 2013. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: Causes and consequences. *Netherlands Journal of Medicine* 71: 174–187.
2. Weisberg, S.P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R.L. Leibel, and A.W. Ferrante Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI19246>.
3. Chen, L., R. Chen, H. Wang, and F. Liang. 2015. Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *International Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1155/2015/58409>.
4. Awan, Z., and J. Genest. 2015. Inflammation modulation and cardiovascular disease prevention. *European Journal of Preventive Cardiology*. <https://doi.org/10.1177/2047487314529350>.
5. Franceschi, C., P. Garagnani, P. Parini, C. Giuliani, and A. Santoro. 2018. Inflammaging: A new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nature Reviews*. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0059-414>.
6. Gems, D., and L. Partridge. 2013. Genetics of longevity in model organisms: Debates and paradigm shifts. *Annual Review of Physiology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183712>.
7. López-Otin, C., M.A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, and G. Kroemer. 2013. The Hallmarks of Aging. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>.

Plasma MiRNAs Are Associated With Inflammation in Older Adults

8. Brasil, Ministério da Saúde. 2011. Plano de ações e estratégias para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011–2022. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Brasília (DF).
9. Duncan, B.B., D. Chor, E.M.L. Aquino, I.M. Bensenor, J.G. Mill, M.J. Schmidt, P.A. Lotufo, A. Vigo, and S.M. Barreto. 2012. Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: Prioridade para enfrentamento e investigação. *Revista de Saúde Pública*. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102012000700017>.
10. World Health Organization. 2018. *Noncommunicable Diseases: Country Profiles 2018*. [s.l.: s.n.].
11. Scarpace, P.J., Matheny, M., Moore, R.L., and Tümer N. 2000. Impaired leptin responsiveness in aged rats. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.3.431>.
12. Canak, M.P., S. Manca di Villahermosa, G. Martino, V. Rovella, A. Noce, A. De Lorenzo, and N. Di Daniele. 2013. Obesity-related metabolic syndrome: Mechanisms of sympathetic overactivity. *International Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1155/2013/865965>.
13. Myers, M.G., Cowley, M.A., and Münzberg, H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annual Review of Physiology*, 208. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100707>.
14. Barba, G., Russo, O., Siani, A., Iacone, R., Farinero, E., Gerardi, M.C., Russo, P., Della Valle, and Strazzullo, P. 2003. Plasma leptin and blood pressure in men: Graded association independent of body mass and fat pattern. *Obesity Research*. <https://doi.org/10.1038/oby.2003.25>.
15. Ortega, F.J., J. Mercaderm, and M. Catalán V., Moreno-Navarrete, J.M., Pucyo, N., and Sabate, R.M. 2013. Targeting the Circulating MicroRNA Signature of Obesity. *Clinical Chemistry*. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.195776>.
16. Rong, Y., W. Bao, Z. Shanm, J. Liu, X. Yu, S. Xia, H. Gao, X. Wang, P. Yao, F.B. Hu, and L. Liu. 2013. Increased MicroRNA-146a Levels in Plasma of Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073272>.
17. Wang, Y., Y. Li, X. Wang, D. Zhang, H. Zhang, Q. Wu, Y. He, J. Wang, L. Zhang, H. Xia, J. Yan, X. Li, and H. Ying. 2013. Circulating miR-130b mediates metabolic crosstalk between fat and muscle in overweight/obesity. *Diabetologia*. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2996-8>.
18. Simionescu, N., L.S. Niculescu, G.M. Sanda, D. Margina, and A.V. Sima. 2014. Analysis of circulating microRNAs that are specifically increased in hyperlipidemic and/or hyperglycemic sera. *Molecular Biology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3449-2>.
19. Cruz, K.J.C., A.R.S. Oliveira, J.B.S. Morais, J.S. Severo, and D.N. Marreiro. 2017. Role of microRNAs on adipogenesis, chronic low-grade inflammation, and insulin resistance in obesity. *Nutrition*. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.10.003>.
20. Keller, A., P. Leidinger, A. Bauer, et al. 2011. Toward the blood-borne miRNome of human diseases. *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1682>.
21. Fisberg, R.M., C.H. Sales, M.M. Fontaneli, J.L. Pereira, M.C.G.P. Alves, M.M.L. Escuder, C.L.G. César, and M. Goldbaum. 2018. 2015 Health Survey of São Paulo with a focus on Nutrition: Rationale, design, and procedures. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu10020169>.
22. Pan American Health Organization (PAHO). 2002. XXXVI Reunión del Comité Asesor de Investigaciones en Salud – Encuesta Multicéntrica – Salud Bienestar y Envejecimiento (SABE) en América Latina y el Caribe – Informe preliminar 2002 (online). <http://www.opas.org/program/sabe.html>. Accessed 17 March 2023.
23. World Health Organization (WHO). 2008. Waist Circumference and Waist-Hip Ratio 2008. World Health Organization (online). <https://www.who.int/publications/i/item/9789241501491>. Accessed 17 March 2023.
24. International Diabetes Federation. 2006. IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome. International Diabetes Federation (online). <https://www.idf.org/library/consensus-statements/60-idf-consensus-worldwide-definition-of-the-metabolic-syndrome.html>. Accessed 18 March 2023.
25. Gelonze, B., A.C.J. Vasques, C.F.C. Stabe, J.C. Pareja, L.E.F.P.L. Rosado, E.C. Queiroz, and M.A. Tambascia. 2009. HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome: Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302009000200020>.
26. Norde, M.M., R.M. Fisberg, D.M.L. Marchioni, and M.M. Rogero. 2020. Systemic low-grade inflammation-associated lifestyle, diet, and genetic factors: A population-based cross-sectional study. *Nutrition*. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.110596>.
27. Tabung, F.K., S.A. Smith-Warner, J.E. Chavarro, K. Wu, C.S. Fuchs, F.B. Hu, A.T. Chan, W.C. Willett, and E.L. Giovannucci. 2016. Development and Validation of an Empirical Dietary Inflammatory Index. *Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.3945/jn.115.228718>.
28. Lumley, T., and A.J. Scott. 2013. Two-sample rank tests under complex sampling. *Biometrika*. <https://doi.org/10.1093/biomet/asd027>.
29. Lumley, T., and A.J. Scott. 2017. Fitting Regression Models to Survey Data. *Statistical Science*. <https://doi.org/10.1214/16-STS605>.
30. Cavanaugh, J.E., and A.A. Neath. 2019. The Akaike information criterion: Background, derivation, properties, application, interpretation, and refinements. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*. <https://doi.org/10.1002/wics.1460>.
31. Dziak, J.J., D.L. Coffman, S.T. Lanza, R. Li, and L.S. Jermain. 2020. Sensitivity and specificity of information criteria. *Briefings in bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bib/bba016>.
32. Shieh, G. 2005. On power and sample size calculations for Wald tests in generalized linear models. *Journal of Statistical Planning and Inference*. <https://doi.org/10.1016/j.jspi.2003.09.017>.
33. R Core Team. 2023. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (online). <https://www.R-project.org/>. Accessed 20 April 2023.
34. Lumley, T. 2020. "Survey: analysis of complex survey samples". R package version 4.0.
35. León-Pedroza, J.L., L.A. González-Tapia, E. del Olmo-Gil, D. Castellanos-Rodríguez, G. Escobedo, and A. González-Chávez. 2014. Low-grade systemic inflammation and the development of metabolic diseases: From the molecular evidence to the clinical practice. *Cirugía y Cirujanos*. <https://doi.org/10.1016/j.circir.2015.05.041>.
36. Sahu, A. 2004. Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0032>.
37. Steiner, A.A., and A.A. Romanovsky. 2007. Leptin: At the crossroads of energy balance and systemic inflammation. *Progress in Lipid Research*. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.11.001>.
38. Myers, M.G., Jr., S.B. Heymsfield, C. Haft, B.B. Kahn, M. Laughlin, R.L. Leibel, M.H. Tschöp, and J.A. Yanovski. 2012.

- Challenges and opportunities of defining clinical leptin resistance. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.002>.
39. Hellström, L., H. Wahrenberg, K. Hruska, S. Reynisdóttir, and P. Arner. 2000. Mechanisms behind gender differences in circulating leptin levels. *Journal of Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2000.00678.x>.
 40. Mazusaki, H., Y. Ogawa, N. Ise, N. Satoh, T. Okazaki, M. Shigemoto, K. Mori, N. Tamura, K. Hosoda, and Y. Yoshimasa. 1995. Human obese gene expression: Adipocyte specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/diab.44.7.855>.
 41. Montague, C.T., J.B. Prins, L. Sanders, J. Zhang, C.P. Sewter, J. Digby, C.D. Byrne, and S. O'Rahilly. 1998. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/diabetes.47.9.1384>.
 42. Casabiell, X., V. Piniro, R. Peiro, M. Lage, J. Camiña, R. Gallego, L.G. Vallejo, C. Dieguez, and F.F. Casanueva. 1998. Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue *in vitro*: Dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.6.4849>.
 43. Piniro, V., X. Casabiell, R. Peinó, M. Lage, J.P. Camiña, C. Menéndez, J. Baltar, C. Dieguez, and F. Casanueva. 1999. Dihydrotestosterone, stanozolol, androstenedione and dehydroepiandrosterone sulphate inhibit leptin secretion in female but not in male samples of omental adipose tissue *in vitro*: Lack of effect of testosterone. *Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1600425>.
 44. Rosembaum, M., and R. Leibel. 1999. Role of gonadal steroids in the sexual dimorphism in body composition and circulating concentrations of leptin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.6.5787>.
 45. López-Jaramillo, P., D. Gómez-Arbeláez, J. López-López, C. López-López, J. Martínez-Ortega, A. Gómez-Rodríguez, and S. Triana-Cubillos. 2014. The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2013-0053>.
 46. Kumar, R., K. Mal, M.K. Razaq, M. Magsi, M.K. Memon, S. Memon, M.N. Afroz, H.F. Siódiqui, and A. Rizwan. 2020. Association of Leptin With Obesity and Insulin Resistance. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.12178>.
 47. Chan, C.B., D. De Leo, J.W. Joseph, T.S. McQuaid, X.F. Ha, F. Xu, R.G. Tsushima, P.S. Pennefather, A.M. Salapatek, and M.B. Wheeler. 2001. Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: Mechanism of action. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.6.1302>.
 48. Sun, L.L., B.G. Jiang, W.T. Li, J.J. Zou, Y.Q. Shi, and Z.M. Liu. 2011. MicroRNA-15a positively regulates insulin synthesis by inhibiting uncoupling protein-2 expression. *Diabetes Research and Clinical Practice*. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2010.11.006>.
 49. Ma, E., Y. Fu, and T. Garvey. 2018. Relationship of Circulating miRNAs with Insulin Sensitivity and Associated Metabolic Risk Factors in Humans. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. <https://doi.org/10.1089/met.2017.0101>.
 50. Lee, D.E., J.L. Brown, M.E. Rosa, L.A. Brown, R.A. Perry Jr., M.P. Wiggs, M.I. Nilsson, S.F. Crouse, J.D. Fluckey, T.A. Washington, and N.P. Greene. 2016. microRNA-16 Is Downregulated During Insulin Resistance and Controls Skeletal Muscle Protein Accretion. *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.25476>.
 51. Heyn, G.S., L.H. Corréa, and K.G. Magalhães. 2020. The Impact of Adipose Tissue-Derived miRNAs in Metabolic Syndrome, Obesity, and Cancer. *Frontiers in Endocrinology*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.563816>.
 52. Sekar, D., V.I. Hairul Islam, K. Thirugnanasambantham, and S. Saravanan. 2014. Relevance of miR-21 in HIV and non-HIV-related lymphomas. *Tumour Biology*. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2068-9>.
 53. Keller, P., V. Gburcik, N. Petrovic, I.J. Gallagher, J. Nedergaard, B. Cannon, and J.A. Timmons. 2011. Gene-chip studies of adipogenesis-regulated microRNAs in mouse primary adipocytes and human obesity. *BMC Endocrine Disorders*. <https://doi.org/10.1186/1472-6823-11-7>.
 54. Guglielmi, V., M. D'Adamo, R. Menghini, M. Castellini, P. Gentile, M. Federici, and P. Sbraccia. 2017. MicroRNA 21 is up-regulated in adipose tissue of obese diabetic subjects. *Nutr Healthy Aging*. <https://doi.org/10.3233/NHA-160020>.
 55. Jeong Kim, Y., S. Jin Hwang, Y. Chan Bae, and J. Sup Jung. 2009. MiR-21 regulates adipogenic differentiation through the modulation of TGF- β signaling in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Stem Cells*. <https://doi.org/10.1002/stem.235>.
 56. Richart, A., X. Loyer, T. Néri, K. Howangyin, C.L. Guérin, A. Ngkelo, W. Bakker, I. Zlatanova, M. Rouanet, J. Vilar, B. Lévy, M. Rothenberg, Z. Mallat, M. Pucfat, and J.S. Silvestre. 2014. MicroRNA-21 coordinates human multipotent cardiovascular progenitors therapeutic potential. *Stem Cells*. <https://doi.org/10.1002/stem.1789>.
 57. Lhamyani, S., A.-M. Gentile, R.M. Giráldez-Pérez, M. Feijóo-Cuaresma, S.Y. Romero-Zerbo, M. Clemente-Postigo, H. Zayed, W.O. Olivera, F.J. Bermúdez-Silva, J. Salas, C.L. Gómez, N. Hajji, G.O. Fuster, F.J. Tinobres, and R. El Bekay. 2020. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.12.027>.
 58. Zhuang, G., C. Meng, X. Guo, P.S. Cheruku, L. Shi, H. Xu, and H. Li. 2012. A novel regulator of macrophage activation: MiR-223 in obesity-associated adipose tissue inflammation. *Circulation*. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.087817>.
 59. Wen, D., P. Qiao, and L. Wang. 2015. Circulating microRNA-223 as a potential biomarker for obesity. *Obesity Research & Clinical Practice*. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2015.01.006>.
 60. Impropa-Caria, A.C., Sousa, R.A.L., Roever, L., Fernandes, T., Oliveira, E.M., Aras Júnior, R., and Souza, R.S.F. 2022. MicroRNAs in type 2 diabetes mellitus: potential role of physical exercise. *Reviews in Cardiovascular Medicine*. <https://doi.org/10.31083/j.rcm.2301029>.
 61. Chakraborty, C., C.G.P. Doss, S. Bandyopadhyay, and G. Agoramorthy. 2014. Influence of miRNA in insulin signaling pathway and insulin resistance: Micro-molecules with a major role in type-2 diabetes. *Wiley Interdisciplinary Reviews*. <https://doi.org/10.1002/wrna.1240>.
 62. Chen, L., J. Cui, J. Hou, J. Long, C. Li, and L. Liu. 2014. A novel negative regulator of adipogenesis: MicroRNA-363. *Stem Cells*. <https://doi.org/10.1002/stem.1549>.
 63. Linhart, H.G., K. Ishimura-Oka, F. De Mayo, T. Kibe, D. Repka, B. Poindexter, R.J. Bick, and G.J. Darlington. 2001. C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.211416898>.
 64. Tang, Q.Q., and M.D. Lane. 2012. Adipogenesis: From stem cell to adipocyte. *Annual Review of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052110-115718>.
 65. Iacomino, G., and A. Siani. 2017. Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. *Genes & Nutrition*. <https://doi.org/10.1186/s12263-017-0577-z>.

Plasma miRNAs Are Associated With Inflammation in Older Adults

66. Ortega, F.J., J.M. Mercader, V. Catalán, J.M. Moreno-Navarrete, N. Puyo, M. Sabater, J. Gómez-Ambrosi, R. Argüelles, J.A. Fernández-Fernández, W. Ricart, G. Frühbeck, and J.M. Fernández-Real. 2013. Targeting the Circulating MicroRNA Signature of Obesity. *Clinical Chemistry*. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.195776>.
67. Zhong, Z., W. Su, and H. Chen. 2021. MicroRNA-532-5p regulates oxidative stress and insulin secretion damage in high glucose-induced pancreatic β cells by downregulating the expression levels of CCND1. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12433>.
68. Taneera, J., J. Fadista, E. Ahlqvist, M. Zhang, N. Wierup, E. Renström, and L. Groop. 2013. Expression profiling of cell cycle genes in human pancreatic islets with and without type 2 diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.05.003>.
69. Shen, J., and B. Zhu. 2018. Integrated analysis of the gene expression profile and DNA methylation profile of obese patients with type 2 diabetes. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8804>.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

CURRÍCULO LATTES



Gabrielli Barbosa de Carvalho

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2235831523402020>

ID Lattes: **2235831523402020**

Última atualização do currículo em 06/11/2023

Nutricionista formada pela Universidade Federal de Sergipe (2017). Mestra em Ciências da Nutrição pela Universidade Federal de Sergipe (2019). Doutoranda no programa pós-graduação Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública (FSP/USP). Trabalha com pesquisa na área de Nutrição, com ênfase em genômica nutricional, doenças crônicas não comunicáveis e micronutrientes. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Gabrielli Barbosa de Carvalho
Nome em citações bibliográficas	CARVALHO, G. B.;DE CARVALHO, GABRIELLI BARBOSA;CARVALHO, GABRIELLI;DE CARVALHO, GABRIELLI B.;CARVALHO, GABRIELLI B. DE;CARVALHO, G.B.;CARVALHO, GABRIELLI B.
Lattes ID	http://lattes.cnpq.br/2235831523402020

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2020	Doutorado em andamento em Doutorado em Nutrição em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP, Brasil. Título: Expressão de microRNA e suas relações com biomarcadores inflamatórios, estado nutricional e padrão alimentar em idosos participantes de estudo de base populacional (ISA Capital)
2017 - 2019	Orientador: Marcelo Macedo Rogero. Mestrado em Ciências da Nutrição. Universidade Federal de Sergipe, UFS, Brasil. Título: Estudo do SNP A35C no gene da SOD-1 (rs2234694), status de zinco, padrão alimentar e risco cardiovascular em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2, Ano de Obtenção: 2019. Orientador: Liliane Viana Pires. Bolsista do(a): Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe, FAPITEC/SE, Brasil. Palavras-chave: diabetes mellitus tipo 2; polimorfismo de nucleotídeo único; padrão alimentar; Zinco; Risco cardiovascular; controle glicêmico.
2013 - 2017	Graduação em Nutrição. Universidade Federal de Sergipe, UFS, Brasil.

Formação Complementar

2020 - 2020	Treinamento Práticas seguras para o trabalho em análises bioquímicas. (Carga horária: 8h). Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP, Brasil.
2020 - 2020	Instrumentos de avaliação de consumo alimentar: aplicação do QFA. (Carga horária: 90h). Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP, Brasil.
2020 - 2020	Instrumentos de avaliação de consumo alimentar: aplicação do R24h. (Carga horária: 90h). Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP, Brasil.
2020 - 2020	Tecnologias e o uso de algoritmos na avaliação do consumo alimentar. (Carga horária: 90h). Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP, Brasil.
2019 - 2019	Suplemento Nutricional: Achando uma luz em meio à escuridão. (Carga horária: 4h). Instituto HIB, HIB, Brasil.
2018 - 2018	



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 05/09/2023

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 3, em Regime de Dedicação Integral à Docência e à Pesquisa, junto ao Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública - USP. Vice-coordenador do Programa de Pós-graduação Nutrição em Saúde Pública da FSP-USP (PROEX, nota 6) desde 2022. Vice-presidente da Comissão de Graduação da FSP-USP desde 2020. Coordenador do Laboratório de Genômica Nutricional e Inflamação (GENUIN) da Faculdade de Saúde Pública - USP desde 2009. 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. 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 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;MACEDO ROGERO, M.
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. 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 peritoneais 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. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Efeitos do exercício e da suplementação com L-glutamina e L-alanil L-glutamina sobre as concentrações de glutamina no plasma, músculo e fígado em ratos, Ano de Obtenção: 2002.