

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA

PAULA NASCIMENTO BRANDÃO LIMA

**Associação entre microRNA circulantes, biomarcadores cardiometabólicos
e dieta em indivíduos adultos participantes de um estudo de base
populacional – ISA-Capital**

São Paulo

2023

PAULA NASCIMENTO BRANDÃO LIMA

**Associação entre microRNA circulantes, biomarcadores cardiometabólicos
e dieta em indivíduos adultos participantes de um estudo de base
populacional – ISA-Capital**

Versão original

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
Nutrição em Saúde Pública para a obtenção do
título Doutora em Ciências.

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública
Orientador: Prof. Assoc. Marcelo Macedo Rogero

São Paulo

2023

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

Lima, Paula Nascimento Brandão
Associação entre microRNA circulantes, biomarcadores
cardiometabólicos e dieta em indivíduos adultos
participantes de um estudo de base populacional - ISA
Capital / Paula Nascimento Brandão Lima; orientador
Marcelo Macedo Rogero. -- São Paulo, 2023.
151 p.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo, 2023.

1. miRNA. 2. Dieta ocidental. 3. Doenças crônicas não
transmissíveis. 4. Síndrome metabólica. 5. Inflamação. I.
Rogero, Marcelo Macedo, orient. II. Título.

BRANDÃO-LIMA, PN. Associação entre microRNA circulantes, biomarcadores cardiometabólicos e dieta em indivíduos adultos participantes de um estudo de base populacional – ISA-Capital. 2023. Tese (Doutorado em Nutrição em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Professor (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Professor (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Professor (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

A ciência é um esforço conjunto, um processo metódico, mas ao mesmo tempo libertador. Meu ciclo na ciência não se resume a essa tese. Foi um percurso iniciado há 13 anos e que contou com o auxílio de instituições e de pessoas muito queridas, às quais eu gostaria de agradecer imensamente.

Ao meu orientador, Marcelo Macedo Rogero, por ter sido um exemplo de profissionalismo, ética e empatia. Foi uma honra ser sua aluna e presenciar o seu amor e dedicação para com o ensino e a ciência.

À Professora Regina Mara Fisberg por ter viabilizado meu trabalho com os dados do ISA-Nutrição, mas, acima de tudo, pela gentileza inigualável e por cada abraço ofertado.

Aos professores Flávia Mori Sarti e Sadraque Lucena, pela parceria e ajuda em cada uma das análises.

Ao Professor John Mathers e a Fiona Malcomson, por participarem de um dos momentos mais transformadores da minha vida e por me receberem com tanto carinho na *Newcastle University*.

À toda equipe ISA-Capital, que desenvolveu um trabalho incrível que possibilitou a formação de diversos mestres e doutores.

À minha família, meu alicerce e o motivo pelo qual cheguei tão longe. Aos meus pais, Paulo e Valquíria, à minha irmã, Viviane, e à minha tia-mãe, Almira. Vocês me inspiram em diversos aspectos, e agradeço por todo o amor e suporte.

Ao meu marido, Thiago Henrique, pelo apoio incondicional, por embarcar nos meus sonhos, por ter sido meu amigo, confidente, psicólogo e meu parceiro científico em vários momentos.

À minha família de coração, meus amigos queridos que se mantêm presentes independentemente da distância física. À Charlene, Ramara e Alexandre, muito obrigada por cada mensagem, meme compartilhado e videochamada.

Ao Arthur Melo, meu agradecimento mais que especial por me apresentar São Paulo, ter sido meu suporte em momentos cruciais e por ter se tornado meu irmão. Eu nunca terei palavras suficientes para lhe agradecer.

À minha eterna orientadora, Liliane Pires, por ter sido a primeira a me mostrar o real significado da ciência, do ensino e a diferença que um professor faz na vida de uma pessoa.

Aos amigos que São Paulo me proporcionou. À Carol, por ter sido a primeira pessoa a me receber no departamento e me fazer sentir bem-vinda. Ao Leandro Cacao e Bruna Ruschel, pelas trocas de ensinamentos e momentos partilhados. À Natália, por ter me ajudado a relembrar a alegria do percurso.

Às universidades públicas, em especial, às minhas duas casas: a Universidade de São Paulo e a Universidade Federal de Sergipe, por ter disponibilizado toda a estrutura física e humana responsável pelo meu crescimento pessoal, profissional e científico.

Ao Programa de Pós-graduação Nutrição em Saúde Pública e a toda equipe da Faculdade de Saúde Pública, agradeço o tempo dedicado no auxílio da nossa formação.

Aos membros do Laboratório de genômica nutricional e inflamação, Tanyara, Gabrielli, Marina, Geni e Rosana, pela gentileza e momentos partilhados.

À cada um dos voluntários que participaram dessa pesquisa, direta ou indiretamente, minha eterna gratidão, e que o conhecimento gerado seja revertido em prol da saúde.

À todas as agências de fomento à pesquisa do Brasil que viabilizam a ciência no país, proporcionam a transformação social e foram cruciais durante um dos períodos mais difíceis que a humanidade enfrentou.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, processos nº 2019/22934-1 e 2021/10940-7.

“A educação é uma das coisas deste mundo em que acredito de maneira inabalável.”

Cecília Meireles

RESUMO

BRANDÃO-LIMA, PN. **Associação entre microRNA circulantes, biomarcadores cardiometabólicos e dieta em indivíduos adultos participantes de um estudo de base populacional – ISA-Capital.** 2023. Tese (Doutorado em Nutrição em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Os microRNA circulantes são pequenos RNA não codificantes que atuam na regulação epigenética, bem como apresentam padrão de expressão específico de acordo com a condição clínica, alimentação e estilo de vida do indivíduo, o que os caracterizam como potenciais biomarcadores de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) e uma ferramenta para o manejo terapêutico. Diante do exposto, o estudo em tela teve como objetivo avaliar o perfil de expressão de microRNA plasmáticos e verificar a sua relação com biomarcadores cardiometabólicos e a dieta em indivíduos adultos participantes de um estudo de base populacional. Trata-se de um estudo de delineamento transversal, com subamostra de 200 indivíduos adultos, com idade de 20 a 59 anos, participantes do estudo ISA-capital realizado em São Paulo, no ano de 2015. Foram avaliados o perfil de expressão plasmática de 21 microRNA, medidas antropométricas, pressão arterial sistêmica, biomarcadores glicêmicos, lipídicos e inflamatórios desses indivíduos. A ingestão alimentar foi estimada por meio de recordatório alimentar de 24 horas. Foram observados diferentes perfis de expressão de microRNA no plasma de acordo com a presença de componentes da síndrome metabólica (SM) e o sexo dos indivíduos. Os miR-16 e miR-363 apresentaram reduzida expressão em mulheres com SM, enquanto homens com um ou mais fatores de risco apresentaram expressão mais elevada de miR-let-7c e miR-30a. Circunferência da cintura elevada modulou positivamente a expressão no plasma dos miR-let-7c, miR-122, miR-30a, miR-146a, miR-15a, miR-30d e miR-222. Similarmente, os miR-30a e miR-122 apresentaram expressão elevada em indivíduos com elevada pressão arterial ou glicemia de jejum / resistência à insulina. Em contrapartida, regulação negativa dos miR-16, miR-363, miR-375 e miR-486 foi observada em indivíduos com reduzida concentração de colesterol associado à HDL. A partir da construção de modelos lineares generalizados foi observado associação entre o consumo de grãos integrais e a expressão de 17 microRNA. O consumo de oleaginosas foi associado à menor expressão plasmática dos miR-140 e miR-139, bem como ao aumento da expressão dos miR-let-7c, miR-122 e miR-222. A modulação plasmática dos microRNA pode ocorrer por diferentes grupos alimentares, fato observado com o miR-122, que também apresentou maior expressão associada ao consumo de leite e grãos integrais. No entanto, foi observada modulação oposta com o consumo de feijões, grãos integrais e carne processada em relação à expressão do miR-30a. O consumo de frutas, carne

vermelha e bebidas açucaradas não apresentou associações com os microRNA avaliados. A partir dos resultados apresentados é possível concluir que a expressão plasmática de microRNA é modulada por fatores de risco cardiometabólico e dieta em indivíduos adultos. No contexto apresentado, foi evidenciado o papel da alimentação como uma ferramenta de redução de risco de DCNT por meio da modulação da expressão plasmática de microRNA.

Descritores: doenças crônicas não transmissíveis, síndrome metabólica, miRNA, inflamação, dieta ocidental, açúcar de adição, grãos integrais, leite e derivados.

ABSTRACT

BRANDÃO-LIMA, PN. **Association between circulating microRNA, cardiometabolic biomarkers, and diet in adult individuals participating in a population-based study - ISA-Capital.** 2023. Tese (Doutorado em Nutrição em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Circulating microRNAs are small non-coding RNAs that play a role in epigenetic regulation and exhibit a specific expression pattern depending on an individual's clinical condition, diet, and lifestyle. This characteristic makes them potential biomarkers for noncommunicable diseases (NCDs) and a tool for therapeutic management. Considering this, the present study aimed to assess the expression profile of plasma microRNAs and examine their relationship with cardiometabolic biomarkers and diet in adult participants of a population-based study. This was a cross-sectional study with a subsample of 200 adults, aged 20 to 59 years, who participated in the ISA-Capital study conducted in São Paulo in 2015. The study evaluated the plasma expression profile of 21 microRNAs, anthropometric measurements, systemic blood pressure, glycemic, lipid, and inflammatory biomarkers of these individuals. Dietary intake was estimated through a 24-hour dietary recall. Different expression profiles of microRNAs were observed in plasma based on the presence of components of metabolic syndrome (MetS) and the individuals' sex. MiR-16 and miR-363 showed reduced expression in women with MetS, while men with one or more risk factors presented higher expression of miR-let-7c and miR-30a. Elevated waist circumference positively modulated the plasma expression of miR-let-7c, miR-122, miR-30a, miR-146a, miR-15a, miR-30d, and miR-222. Similarly, miR-30a and miR-122 showed elevated expression in individuals with high blood pressure or fasting glucose/insulin resistance. Conversely, negative regulation of miR-16, miR-363, miR-375, and miR-486 was observed in individuals with reduced high-density lipoprotein-associated cholesterol concentration. From the analysis of generalized linear models, an association was observed between whole grain consumption and the expression of 17 microRNAs. Nut consumption was associated with lower plasma expression of miR-140 and miR-139, as well as increased expression of miR-let-7c, miR-122, and miR-222. Plasma modulation of microRNAs may occur through different food groups, as observed with miR-122, which also showed higher expression associated with milk and whole grain consumption. However, opposite modulation was observed with the consumption of beans, whole grains, and processed meat in relation to miR-30a expression. The consumption of fruits, red meat, and sugary drinks showed no associations with the evaluated microRNAs. Based on the presented results, it can be concluded that the plasma expression of microRNAs is modulated by cardiometabolic risk

factors and diet in adults. In this context, the role of diet was highlighted as a tool for reducing the risk of NCDs through the modulation of plasma microRNA expression.

Keywords: chronic non-communicable diseases, metabolic syndrome, miRNA, inflammation, Western diet, added sugar, whole grains, milk, dairy products.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGO	Argonautas
AIC	Cr�terio de Informação de Akaike
AKT	Proteína quinase B
AMP	Monofosfato c�clico de adenosina
ARE	Elementos ricos em AU
C/EBP�	Proteína CCAT/enhancer-binding �
COX	Ciclooxigenase
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region 8
DHA	�cido docosaexaenoico
DICER	RNase III endonuclease
DROSHA	Ribonuclease III enzyme
EDTA	�cido etilenodiaminotetracético
FOXO1	Forkhead box O1
FXR1	Proteína 1 relacionada ao retardo mental ligado ao X frágil
GLM	Generalized linear models
GLUT-4	Transportador de glicose 4
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IL-4	Interleucina-4
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
JNK	Proteína quinase c-Jun N terminal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPK1	Proteína quinase ativada por mitógeno 1
MAPK14	Proteína quinase ativada por mitógeno 14
MICRORNPS	complexo miRNA-proteína
MRNA	RNA mensageiro
NF-�B	Fator nuclear kappa B
NPM1	Nucleofosmina 1
PPARC1A	Coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PPAR�	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama

RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
R24H	Recordatório alimentar de 24 horas
SM	Síndrome metabólica
SR-BI	Scavenger receptor class B type I
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
UTR	Região não traduzidas
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 MicroRNA	16
1.2 MicroRNA circulantes e doenças crônicas não transmissíveis	19
1.3 Alimentação, estilo de vida e microRNA	24
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS QUE COMPOEM A TESE	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Amostragem ISA-Nutrição 2015	31
4.2 Delineamento do estudo	32
4.3 Coleta de dados	32
4.3.1 Dados antropométricos e de pressão arterial sistêmica	32
4.3.2 Dados dietéticos	33
4.3.3 Material biológico	33
4.4 Determinação de marcadores glicêmicos e lipídicos	34
4.5 Determinação dos biomarcadores inflamatórios	35
4.6 Análise do perfil de expressão de microRNA	35
4.7 Determinação do consumo de grupos alimentares	37
4.8 Determinação do índice inflamatório da dieta (<i>Dietary Inflammatory Index - DII</i> [®])	39
4.9 Aspectos éticos	40
4.10 Análise estatística	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Primeiro Manuscrito	43
5.2 Segundo Manuscrito	68
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	86
REFERÊNCIAS	87
ANEXO A – Comprovante de aprovação no comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Saúde Pública	94
ANEXO B – Currículo Lattes discente	98

ANEXO C – Currículo Lattes orientador	99
--	-----------

1 INTRODUÇÃO

1.1 MicroRNA

MicroRNA são RNA de fita simples, não codificadores, contendo 18 a 25 nucleotídeos, que regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente por meio da sua ligação a um RNA mensageiro (mRNA), causando tanto a inibição da tradução quanto a degradação do mRNA (HA; KIM, 2014; KILIC *et al.*, 2018; O'BRIEN *et al.*, 2018). São identificados como uma das famílias primordiais de genes reguladores em organismos eucariontes (YAO; CHEN; ZHOU, 2019). Identificados pela primeira vez, em 1993, por um grupo de pesquisadores da Universidade de Havard, os microRNA participam de diversos processos biológicos no organismo humano (FEINBAUM; AMBROS; LEE, 1993). Até o momento, foram identificados cerca de 4000 microRNA humanos, dos quais pelo menos 30% apresentam-se como potenciais biomarcadores para doenças (KILIC *et al.*, 2018).

Mais de dois terços de todos os microRNA humanos são codificados em regiões intervenientes (íntrons) de genes que codificam proteínas, bem como em RNA longos não codificantes, os quais apresentam mais de 200 nucleotídeos e não são traduzidos em proteínas. Os microRNA também podem ser codificados em éxons ou íntrons, dependendo do processo de *splicing* alternativo do pré-mRNA. Além disso, os microRNA podem ter origem intergênica, ou seja, podem ser encontrados em regiões cromossômicas entre dois genes (RANGANATHAN; SIVASANKAR, 2014). A transcrição ocorre no núcleo celular a partir de genes precursores de microRNA (gene mir) com auxílio da RNA polimerase II ou III (CATALANOTTO; COGONI; ZARDO, 2016; YING; CHANG; LIN, 2008). Após a transcrição, ainda no núcleo celular, os microRNA primários são clivados pelo complexo formado pelas proteínas DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) e Drosha (*ribonuclease III enzyme*), originando o microRNA precursor (CATALANOTTO; COGONI; ZARDO, 2016; RANGANATHAN; SIVASANKAR, 2014; YING; CHANG; LIN, 2008). Este é então transportado pela exportina 5 para o citoplasma onde é convertido em microRNA maduro devido à ação da Dicer (RNase III endonuclease). As vias não-canônicas de biogênese podem ocorrer por vias independentes da Drosha/DGCR8 ou da Dicer (HA; KIM, 2014; KILIC *et al.*, 2018; O'BRIEN *et al.*, 2018).

Tanto os microRNA maduros quanto os precursores podem se associar a proteínas como, por exemplo, as argonautas (AGO), lipoproteína de alta densidade (*High Density Lipoprotein* – HDL), lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein* – LDL) e

nucleofosmina 1 (NPM1), ou ainda, podem ser empacotados em vesículas (exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos). Não há consenso acerca do tipo de microRNA circulante mais abundante, uma vez que alguns autores sugerem que a maior parte dos microRNA extracelulares estaria ligada a proteínas AGO, enquanto outros afirmam que seriam os exossomos (O'BRIEN *et al.*, 2018). No entanto, esse fator pode estar relacionado ao tipo de microRNA, local de origem e às condições fisiológicas do indivíduo (O'BRIEN *et al.*, 2018). Desse modo, os microRNA são encontrados em todos os tecidos e em diversos fluidos corporais (por exemplo, soro, plasma, saliva e leite materno) (CRUZ *et al.*, 2017; QUINTANILHA *et al.*, 2017; TAKIZAWA; MATSUZAKI; OCHIYA, 2022).

Os microRNA podem exercer suas funções regulatórias no meio intracelular ou serem secretados para os fluidos extracelulares por mecanismos ainda não totalmente elucidados (CRUZ *et al.*, 2017; O'BRIEN *et al.*, 2018; QUINTANILHA *et al.*, 2017). Sugere-se que os microRNA são liberados de forma regulada (O'BRIEN *et al.*, 2018). A secreção de microRNA pode ser mediada por uma via dependente de ceramida; estimulada por moléculas sinalizadoras, como interleucina-4 (IL-4) e ácido docosaenoico (DHA); devido estresse de cisalhamento laminar ateroprotetor; liberados por exocitose por meio da fusão de vesículas (O'BRIEN *et al.*, 2018).

O mecanismo de ação dos microRNA ocorre por intermédio de pareamento com as regiões 3' ou 5' não traduzidas (UTR), bem como com regiões codificadoras do mRNA alvo. Um único microRNA pode interagir com diversos alvos, sendo essa característica regulada pela *seed sequence*, região localizada entre os nucleotídeos 2-8, que é responsável por definir a função e a especificidade do microRNA (O'BRIEN *et al.*, 2018). O microRNA maduro interage com o mRNA alvo incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (CATALANOTTO; COGONI; ZARDO, 2016; RANGANATHAN; SIVASANKAR, 2014). Com isso, o microRNA-RISC induz a repressão da tradução ou aumenta a degradação do mRNA (CATALANOTTO; COGONI; ZARDO, 2016). Alguns fatores, como a funcionalização da compartimentalização e o transporte do microRNA-RISC no interior das células, desempenham papel crucial na regulação da expressão gênica mediada por microRNA (O'BRIEN *et al.*, 2018).

A atuação amplamente conhecida dos microRNA é a de inibição da expressão gênica, principalmente, por meio da desestabilização ou repressão traducional, tendo como alvo a região 3' não traduzida (3'UTR) dos transcritos de mRNA presentes no citoplasma (HUANG *et al.*, 2012; PLACE *et al.*, 2008). Não obstante, alguns estudos indicam que microRNA podem também atuar positivamente na regulação da expressão gênica por meio da interação com

elementos promotores, sendo esse evento designado ativação do RNA (RNAa) (HUANG *et al.*, 2012; PLACE *et al.*, 2008). Nesse contexto, em células privadas de soro, AGO2 e outra proteína relacionada ao complexo miRNA-proteína (microRNPs) — Proteína 1 relacionada ao retardo mental ligado ao X frágil (FXR1) —, foram associadas a elementos ricos em AU (ARE) na região 3' UTR para ativar a etapa de tradução do mRNA (VASUDEVAN; STEITZ, 2007). No entanto, mais estudos são necessários a fim de esclarecer esses mecanismos.

No meio intracelular, os microRNA são conhecidos por modularem a expressão gênica, por meio da regulação de vias de sinalização (IFTIKHAR; CARNEY, 2016a; O'BRIEN *et al.*, 2018). Enquanto isso, no meio extracelular, os microRNA 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 a partir dos mesmos mecanismos utilizados por microRNA endógenos (CHEN *et al.*, 2012; IFTIKHAR; CARNEY, 2016a). Já os microRNA ligados às proteínas podem ser captados por receptores específicos localizados na membrana celular como, por exemplo, microRNA ligados à partícula de HDL, que são, provavelmente, captados pelo receptor SR-BI (*scavenger receptor class B type I*) (CHEN *et al.*, 2012; IFTIKHAR; CARNEY, 2016b). Evidências apontam ainda interação direta de microRNA 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; CALIN, 2017; FABBRI, 2017; IFTIKHAR; CARNEY, 2016b).

Mais recentemente, estudos identificaram a atuação de microRNA circulantes como moléculas de sinalização intercelular, atuando de forma autócrina, parácrina e endócrina (CRUZ *et al.*, 2017; O'BRIEN *et al.*, 2018; OSELLA *et al.*, 2014). Visto a capacidade de um único microRNA interagir com múltiplos genes, as vias de atuação dos microRNA estabelecem uma ampla rede entrecruzada, podendo um único microRNA estar associado com mais de uma via metabólica (CRUZ *et al.*, 2017; O'BRIEN *et al.*, 2018; OSELLA *et al.*, 2014).

Os microRNA circulantes podem refletir condições fisiológicas específicas, fato que os tornam potenciais biomarcadores relacionados ao risco de desenvolvimento de DCNT (BRANDÃO-LIMA *et al.*, 2022a; TAKIZAWA; MATSUZAKI; OCHIYA, 2022). Cabe destacar que microRNA são resistentes à ação de RNases, estáveis ao aquecimento, às alterações de pH e à estocagem em longo prazo (O'BRIEN *et al.*, 2018; TAKIZAWA; MATSUZAKI; OCHIYA, 2022). Contudo, é necessário considerar fatores que podem impactar as concentrações circulantes (TAKIZAWA; MATSUZAKI; OCHIYA, 2022). Entre eles, podemos citar características individuais, como idade e sexo, além de hábitos de vida, como

alimentação e atividade física (MANTILLA-ESCALANTE *et al.*, 2019; QUINTANILHA *et al.*, 2017; TAKIZAWA; MATSUZAKI; OCHIYA, 2022).

Nesse sentido, o estudo de microRNA envolvidos em vias relacionadas ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) pode tanto auxiliar na ampliação do entendimento acerca dessas doenças quanto no diagnóstico precoce de alterações metabólicas relacionadas (ORTEGA *et al.*, 2014; PESCADOR *et al.*, 2013; PRATS-PUIG *et al.*, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

1.2 MicroRNA circulantes e doenças crônicas não transmissíveis

As DCNT apresentam expressiva participação na morbimortalidade mundial e representam o principal desafio do século 21, tanto para os sistemas de saúde quanto para a economia dos países (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). De acordo com as estimativas publicadas pela rede de colaboração *Global Burden of Disease*, as DCNTs são responsáveis por 41 milhões de mortes anualmente, das quais 77% ocorrem em nações de renda baixa e média (MURRAY *et al.*, 2020).

Entre as DCNT, as doenças cardiovasculares lideram as estatísticas, contribuindo com a maior parcela de óbitos ao ano (17,9 milhões), seguido das mortes causadas por câncer (9,3 milhões), doenças respiratórias crônicas (4,1 milhões) e diabetes (2,0 milhões) (MURRAY *et al.*, 2020). O atual cenário do Brasil acompanha as estimativas mundiais e, embora seja observada redução nas taxas de mortalidade por doenças do aparelho circulatório, as DCNT foram responsáveis por 55 % de todas as mortes (MANSUR; BARROSO, 2023).

As DCNT estão intrinsecamente ligadas à síndrome metabólica (SM), uma condição multifatorial caracterizada pela presença simultânea de alterações fisiopatológicas que englobam o sistema cardiovascular, metabolismo glicêmico e lipídico, bem como acúmulo de gordura corporal (RAMZAN; VICKERS; MITHEN, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Estudos tem investigado a relação complexa entre as DCNTs e a SM, a fim de esclarecer as interconexões entre os fatores genéticos, epigenéticos e comportamentais (BIANCHI *et al.*, 2017; BRANDÃO-LIMA *et al.*, 2022b; FLOWERS; WON; FUKUOKA, 2015; RAMZAN; VICKERS; MITHEN, 2021).

Nesse contexto, os microRNA surgem como uma das vias de interconexão entre esses fatores, uma vez que estão diretamente ligados aos fatores genéticos e epigenéticos (BIANCHI *et al.*, 2017; BRANDÃO-LIMA *et al.*, 2022b), e, indiretamente, aos fatores comportamentais (FLOWERS; WON; FUKUOKA, 2015). Em termos genéticos, variações nos genes que

codificam microRNA ou em seus alvos resultam na alteração da expressão gênica e podem influenciar a predisposição para DCNT (HAJIBABAIE *et al.*, 2022). Por outro lado, os microRNA regulam a expressão gênica por meio de alterações pós-transcricionais, da metilação do DNA e modificação de histonas, o que pode levar a alterações epigenéticas associadas a DCNT (RAMZAN; VICKERS; MITHEN, 2021). Além disso, fatores comportamentais como dieta, exercício físico e tabagismo podem modular a expressão de microRNA (FLOWERS; WON; FUKUOKA, 2015).

Vários microRNA circulantes têm sido objeto de estudo no contexto das DCNT, entre eles os 13 microRNA mais frequentemente investigados: miR-146a, miR-222, miR-126, miR-130b, miR-142, miR-423, miR-21, miR-532, miR-28, miR-122, miR-140, miR-143 e miR-486 (BRANDÃO-LIMA *et al.*, 2022b). Uma revisão sistemática desenvolvida na temática apontou a associação do miR-222 com todos os fatores de risco para o desenvolvimento de SM (BRANDÃO-LIMA *et al.*, 2022b). Além disso, observou-se associação dos miR-126, miR-221 e miR-423 com adiposidade, metabolismo lipídico e glicêmico (BRANDÃO-LIMA *et al.*, 2022b). Ademais, os microRNA circulantes apresentaram perfis de expressão de acordo com a condição clínica dos indivíduos, sendo o acúmulo de gordura corporal um dos principais fatores associados (BRANDÃO-LIMA *et al.*, 2022b).

Estudos realizados em animais vêm demonstrando possíveis mecanismos de ação de microRNA na adipogênese, entre eles a inibição da proteína quinase ativada por mitógeno 1 (MAPK 1), o que acarreta no aumento do tamanho e do número de adipócitos (CRUZ *et al.*, 2017; ISHIDA *et al.*, 2014). Outro possível mecanismo diz respeito ao aumento da expressão da proteína CCAT/*enhancer-binding* α (C/EBP α) e do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ), o que favorece a diferenciação de adipócitos (KARBIENER *et al.*, 2011). Além disso, o aumento da expressão de miR-375 em adipócitos 3T3-L1 foi relacionado à redução da expressão das proteínas quinases ERK1/2 (LING *et al.*, 2011). Outro microRNA identificado com ação na adipogênese, o miR-146b promove a diferenciação de adipócitos por meio da inibição da sirtuína 1 e aumento da acetilação da FOXO1 (*forkhead box O1*) (AHN *et al.*, 2013). Análises de bioinformática demonstraram diferentes padrões de expressão de, ao menos, 16 microRNA e 192 genes no tecido adiposo de indivíduos com obesidade quando comparados aos indivíduos não obesos (LI *et al.*, 2015).

No estudo conduzido por Prats-Puig *et al.* (2013), indivíduos com obesidade apresentaram associação positiva entre a expressão plasmática do miR-486-5p e do miR-130b, com indicadores antropométricos e as concentrações plasmáticas de proteína C reativa, HDL-c e triacilglicerol. De maneira similar, Ma, Fu e Garvey (2018) observaram a relação positiva da

expressão no plasma dos miR-16 e miR-150 com a sensibilidade à ação da insulina, bem como relação negativa com as medidas de circunferência da cintura e concentrações plasmáticas de triacilglicerol (MA; FU; GARVEY, 2018).

A associação entre a expressão do miR-130b e obesidade em humanos também foi demonstrada por Wang et al. (2013), sendo observada no estudo elevada expressão sérica desse microRNA em indivíduos com sobrepeso/obesidade e positiva correlação com IMC, percentual de gordura corporal, circunferência da cintura e concentração plasmática de triacilglicerol. Wang et al. (2013) afirmaram que a expressão sérica de miR-130b representa um biomarcador para obesidade (sensibilidade de 70% e especificidade de 95%) e SM (sensibilidade de 55% e especificidade de 96%).

Além disso, alguns microRNA modulam a infiltração de macrófagos no tecido adiposo e a polarização dessas células do fenótipo anti-inflamatório (M2) para o pró-inflamatório (M1), fatores determinantes para o desenvolvimento da inflamação crônica, sistêmica e de baixo grau e resistência à ação da insulina (CRUZ *et al.*, 2017; ZHUANG *et al.*, 2012). Nesse contexto, a atuação dos microRNA pode ocorrer por meio da redução da expressão do fator regulador 4 de interferon, reduzindo o número de macrófagos do tipo M2 (PRATS-PUIG *et al.*, 2013).

Observa-se ainda o estímulo para a síntese do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) a partir de adipócitos mediante ativação da subunidade p65 do fator de transcrição designado fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) (CRUZ *et al.*, 2017; ZHUANG *et al.*, 2012). Entre os microRNA envolvidos nesses processos, encontra-se o miR-223, o qual apresenta expressão plasmática reduzida em indivíduos com diabetes tipo 2 (ZAMPETAKI *et al.*, 2010). Outro mecanismo observado é a ativação da lipólise devido a fosforilação da enzima lipase hormônio-sensível e a redução da expressão gênica da enzima fosfodiesterase 3 B, a qual está envolvida na redução das concentrações intracelulares de AMP cíclico (CRUZ *et al.*, 2017; ZHUANG *et al.*, 2012).

MicroRNA podem ainda aumentar a concentração plasmática de ácidos graxos por meio do aumento da expressão do complexo enzimático ácido graxo sintase, somado a redução da expressão do receptor da adiponectina 1 e da proteína Ets-1, promovendo a hipóxia e a inflamação do tecido adiposo. Além disso, a liberação de citocinas pró-inflamatórias pode induzir a expressão de microRNA em indivíduos com obesidade, sendo demonstrado por alguns autores aumento da expressão do miR-146b, em resposta as concentrações de TNF- α e IL-6 (CHEN *et al.*, 2014; GU *et al.*, 2016; SHI *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2013). Além disso, o miR-486 está relacionado à ativação da via de sinalização do fator de transcrição NF- κ B e da inibição do fator de transcrição FOXO1 (PRATS-PUIG *et al.*, 2013).

Em indivíduos com SM foi observada redução na expressão plasmática do miR-16 e miR-363, enquanto foi observado aumento da expressão do miR-let-7c e miR-30a, quando comparados aos indivíduos sem SM (BRANDÃO-LIMA *et al.*, 2022a). Conjuntamente, verificou-se correlação negativa do microRNA com os valores de IMC e de circunferência da cintura (BRANDÃO-LIMA *et al.*, 2022a). Resultado similar foi observado em indivíduos normoglicêmicos e de peso estável, nos quais o miR-16 apresentou associação negativa com circunferência da cintura e concentrações de triglicerídeos, além de correlação positiva com HDL-c (MA; FU; GARVEY, 2018). Do mesmo modo, o miR-16 foi associado ao desenvolvimento de resistência à ação da insulina e a fatores de risco metabólico que compõem a SM (MA; FU; GARVEY, 2018).

Com relação ao miR-let-7c, sua elevada expressão pode repercutir negativamente no sistema cardiovascular, uma vez que, nessas condições, foi previamente demonstrada a ocorrência de apoptose das células endoteliais por meio da inibição da molécula Bcl-XL (QIN *et al.*, 2012). Outrora, Giardina *et al.* (2019) demonstraram associação positiva do miR-let-7c com as concentrações de LDL-c, colesterol total e triglicerídeos (GIARDINA, S.; HERNANDEZ-ALONSO, P.; DIAZ-LOPEZ, A.; SALAS-HUETOS, A.; SALAS-SALVADÓ, J.; BULLÓ *et al.*, 2019).

Diversas vias do metabolismo glicêmico apresentam participação de microRNA, o que justifica seu papel no desenvolvimento de resistência à ação da insulina. Estudos em animais foram capazes de demonstrar a ação de microRNA na inibição do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), da proteína quinase B (Akt), fosfatidilinositol 3-quinase e da fosfofrutoquinase, além da supressão dos genes da enzima glicose-6-fosfatase e do coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (*PPARCIA*) (CRUZ *et al.*, 2017). Alternativamente, mecanismos envolvendo a redução da expressão do transportador de glicose 4 (GLUT-4), proteína quinase ativada por mitógeno 14 (MAPK14) e caveolina-1 (Cav-1) vem sendo descobertos (KAROLINA; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2011).

Estudos realizados em humanos, apontam para o surgimento de alterações no perfil plasmático de microRNA anteriormente ao desenvolvimento de diabetes tipo 2. Entre eles, os miR-150, miR-30 e miR-15a apresentam diferenças significativas na expressão plasmática quando comparados indivíduos com diabetes tipo 2, pré-diabetes e sem alterações glicêmicas (AL-KAJAJI *et al.*, 2015; JIMÉNEZ-LUCENA *et al.*, 2018; ZAMPETAKI *et al.*, 2010). Jiménez-Lucena *et al.* (2018) demonstraram, por meio de análises de regressão, que indivíduos com maior expressão plasmática de miR-150 e miR-30 e menor expressão de miR-15a apresentaram maior risco para desenvolvimento de diabetes tipo 2. Correlação positiva da

expressão plasmática do miR-222 com glicemia de jejum e hemoglobina glicada também foi observada em um estudo realizado com um grupo de indivíduos com diabetes tipo 2 (ORTEGA *et al.*, 2014). Em outro estudo, autores observaram a presença do miR-126 entre os microRNA mais associados ao diabetes tipo 2, sendo a reduzida expressão desse microRNA relacionada ao aumento da glicemia (ZAMPETAKI *et al.*, 2010).

Previamente, em indivíduos suecos com diabetes tipo 2 (n = 33), foi demonstrada regulação positiva do miR-486 quando comparada ao grupo normoglicêmico (n = 119) (WANG *et al.*, 2014). No mesmo estudo, autores demonstraram associação desse microRNA ao aumento da probabilidade de desenvolvimento de diabetes tipo 2 na população total (WANG *et al.*, 2014). Em contrapartida, na análise realizada no estudo Bruneck observou-se redução da expressão plasmática do miR-486 em indivíduos com diabetes tipo 2. Além disso, foi demonstrada correlação negativa do microRNA com as concentrações de glicose tanto em indivíduos com diabetes tipo 2 quanto em indivíduos normoglicêmicos (ZAMPETAKI *et al.*, 2010).

Papel similar é desempenhado pelo miR-375 no desenvolvimento de DCNT, cuja expressão reduzida está associada ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 (JIMÉNEZ-LUCENA *et al.*, 2018), bem como à SM. Esse fato deve-se a sua atuação na regulação da secreção de insulina pelas células beta pancreáticas (REIS *et al.*, 2019). Autores demonstraram a redução da expressão plasmática do miR-375 de acordo com o ganho de peso corporal e com a presença de SM (BRANDÃO-LIMA *et al.*, 2022a). Kong *et al.* (2011) observaram expressão aumentada desse microRNA em indivíduos com diabetes tipo 2 recém diagnosticada, quando comparados aos indivíduos normoglicêmicos. Posteriormente, Jiménez-Lucena *et al.* (2018) demonstraram que a desregulação plasmática do miR-375 ocorria anos antes do desenvolvimento de pré-diabetes e diabetes tipo 2, sendo observada expressão reduzida nos indivíduos com diabetes tipo 2.

Diante do exposto, nota-se que a desregulação da expressão plasmática de microRNA está associada a diversas alterações metabólicas relacionadas ao desenvolvimento de DCNT, podendo ser identificada anos antes da instalação dessas doenças. De maneira mais ampla, observa-se a possibilidade de modulação do perfil de expressão de microRNA por meio da alteração de aspectos comportamentais dos indivíduos. Desse modo, 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.

1.3 Alimentação, estilo de vida e microRNA

A epigenética pode ser descrita como mudanças hereditárias na expressão gênica, independentes de alterações na sequência de nucleotídeos do DNA. Os principais mecanismos epigenéticos conhecidos incluem a metilação do DNA, as modificações pós-transcricionais (acetilação, metilação, fosforilação, entre outras) nas proteínas histonas e a atividade de RNA não-codificantes, em especial os microRNA (PILETIC; KUNEJ, 2016).

Visto as funções exercidas pelos microRNA sem alteração na sequência de DNA, autores os consideram moduladores epigenéticos. Da mesma maneira, os microRNA podem ser alvo de modificações epigenéticas, modulando assim as taxas de transcrição (OSELLA *et al.*, 2014; PILETIC; KUNEJ, 2016). Fatores como a hiperglicemia, hiperinsulinemia, liberação de citocinas pró-inflamatórias e o aumento ou redução de peso corporal são capazes de reduzir ou aumentar a expressão de microRNA em indivíduos (CRUZ *et al.*, 2017). Cabe destacar que o padrão alimentar pode influenciar a resposta epigenética, uma vez que a síntese endógena de microRNA pode ser modulada por nutrientes e compostos bioativos presentes nos alimentos (BAIER *et al.*, 2014; TARALLO *et al.*, 2014). Estudos vêm paulatinamente demonstrando associação entre os hábitos alimentares e expressão de microRNA em humanos (CORRÊA *et al.*, 2020; GIARDINA, S.; HERNANDEZ-ALONSO, P.; DIAZ-LOPEZ, A.; SALAS-HUETOS, A.; SALAS-SALVADÓ, J.; BULLÓ *et al.*, 2019; HEIANZA *et al.*, 2023; REIS *et al.*, 2019).

A dieta hiperlipídica, um dos modelos largamente estudados, mostrou-se capaz de alterar a expressão de microRNA no tecido adiposo e nas células renais, ovarianas e das ilhotas pancreáticas, fato observado em modelos de obesidade induzida em animais (PALMER *et al.*, 2014). No entanto, nota-se que a característica da resposta seria dependente do tipo de lipídio consumido (PALMER *et al.*, 2014). O consumo de ácidos graxos poli-insaturados, por exemplo, foi associado a redução do risco de DCNT, visto que diminuiu a expressão de microRNA relacionados à resposta pró-inflamatória em estudos realizados *in vitro* (PALMER *et al.*, 2014; QUINTANILHA *et al.*, 2017).

Em um estudo realizado com mulheres, após o consumo de uma refeição com elevado teor de gordura saturada, observou-se alteração na expressão plasmática de 33 microRNA entre os 752 microRNA avaliados (QUINTANILHA *et al.*, 2020). Ademais, no mesmo estudo verificou-se que a alteração da expressão de microRNA foi acompanhada do aumento significativo das concentrações plasmáticas de lipopolissacarídeos (LPS), TNF- α e molécula de

adesão celular vascular-1 (VCAM-1) (QUINTANILHA *et al.*, 2020). Entretanto, em um estudo realizado com indivíduos com sobrepeso e obesidade, o consumo de uma dieta com baixo teor de gorduras promoveu a redução nas concentrações do miR-139, miR-432 e miR-423 (GIARDINA, S.; HERNANDEZ-ALONSO, P.; DIAZ-LOPEZ, A.; SALAS-HUETOS, A.; SALAS-SALVADÓ, J.; BULLÓ *et al.*, 2019). Autores observaram associação entre as alterações nas concentrações plasmáticas do miR-139 e miR-let-7c e mudanças no perfil lipídico e resistência à insulina (GIARDINA, S.; HERNANDEZ-ALONSO, P.; DIAZ-LOPEZ, A.; SALAS-HUETOS, A.; SALAS-SALVADÓ, J.; BULLÓ *et al.*, 2019).

A ingestão de ácidos graxos *trans* é classicamente relacionada ao aumento da concentração plasmática de LDL-c e elevação do risco cardiovascular. Aliado a esse fato, ácidos graxos *trans* apresentam relação com a expressão de microRNA quantificados em frações de HDL (DESGAGNÉ *et al.*, 2016). Ao ofertar dietas com elevado teor de ácidos graxos *trans*, em um estudo duplo cego, Desgagné *et al.* (2016) verificaram correlação negativa entre a expressão do miR-223 e a concentração plasmática de HDL, além de correlação positiva com as concentrações de proteína C reativa. Em adição, a expressão do miR-135a nas partículas de HDL foram positivamente correlacionadas com as concentrações plasmáticas de triacilgliceróis e LDL-c (DESGAGNÉ *et al.*, 2016).

De maneira similar, a expressão plasmática de microRNA pode ser modulada pela ingestão de dietas com baixo teor de lipídios. No estudo de Assmann *et al.* (2020), a alteração da expressão plasmática de nove microRNA em indivíduos com obesidade foi associada ao consumo de uma dieta com baixo teor de gordura por 16 semanas. Para o grupo que consumiu a dieta com baixo teor de gordura, os autores observaram ainda que sete microRNA (miR-130a-3p, miR-142-5p, miR-144-5p, miR-15a-5p, miR-22-3p, miR-221-3p e miR-29c-3p) apresentaram valores de expressão significativamente diferentes entre os indivíduos que reduziram o peso corporal em comparação aos indivíduos que não reduziram após as 16 semanas de intervenção (ASSMANN *et al.*, 2020).

Efeito positivo também pode ser observado a partir do consumo de dietas com alto teor de fibras alimentares (PALMER *et al.*, 2014). Estudo realizado em linhagem de células de câncer de cólon demonstrou que o tratamento com butirato – ácido graxo de cadeia curta oriundo da fermentação de fibras dietéticas – diminuiu significativamente a expressão do miR-17, o qual está relacionado ao desenvolvimento de câncer de cólon e outros tipos de cânceres (HU *et al.*, 2011). Outros compostos como resveratrol, quercetina, catequinas, vitaminas e minerais apresentam indícios de efeitos benéficos para a saúde por meio da modulação de microRNA (QUINTANILHA *et al.*, 2017).

O resveratrol, por exemplo, promove a redução de mediadores lipídicos pró-inflamatórios por meio da inibição das enzimas ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1 e 2), redução da translocação subunidade p65 do NF- κ B, bem como atenua a ativação da proteína quinase c-Jun N terminal (JNK). Desse modo, células tratadas com resveratrol apresentaram aumento de microRNA envolvidos nas vias anti-inflamatórias como miR-663, além de redução de microRNA pró-inflamatórios como o miR-155 e miR-21 (QUINTANILHA *et al.*, 2017).

Além disso, a deficiência de nutrientes também pode alterar a expressão de microRNA. Em células intestinais, a deficiência de selênio foi capaz de alterar negativamente a expressão de 12 microRNA, tendo como possíveis vias de atuação o metabolismo do ácido araquidônico, metabolismo da glutathione e estresse oxidativo (QUINTANILHA *et al.*, 2017). Já a suplementação de homens idosos com 200 μ g selênio e 200 mg de coenzima Q10 por dia, durante quatro anos, proporcionou alteração significativa na expressão plasmática de mais de 100 microRNA, os quais estavam relacionados à redução do risco cardiovascular, do estresse oxidativo e da resposta inflamatória (ALEHAGEN *et al.*, 2017). O zinco também se mostra relevante, uma vez que a sua deficiência pode causar aumento da expressão de genes pró-inflamatórios, como, por exemplo, *TNF- α* , *S100a8*, *Il1b*, *Cxcl2*, *Tlr4*, e a alteração da expressão de microRNA em tecidos animais (ALDER *et al.*, 2012; BECKETT *et al.*, 2014; QUINTANILHA *et al.*, 2017). Em humanos, a expressão de alguns microRNA foi modulada por meio de uma dieta restrita em zinco, sendo esse efeito revertido após a reposição desse micronutriente (QUINTANILHA *et al.*, 2017).

Ferrero *et al.* (2021) investigaram o efeito do consumo de 23 componentes alimentares das classes de lipídios, microelementos e vitaminas na expressão de microRNA circulantes, em 120 indivíduos, sob diferentes padrões dietéticos (onívoros, vegetarianos e veganos). As análises demonstraram que o consumo de 13 componentes alimentares (colesterol, zinco, ácido oleico, PUFA, entre outros) foi associado à expressão de 78 microRNA, independente da dieta adotada (FERRERO *et al.*, 2021). Entre os nutrientes analisados pelos autores, o sódio, o colesterol, a vitamina D e a vitamina E foram os que mais se correlacionaram com os perfis de expressão de microRNA (FERRERO *et al.*, 2021). A ingestão de sódio foi associada a alterações nas concentrações de 16 microRNA plasmáticos, sendo destacado o miR-23a-3p, encontrado com frequência em vesículas plasmáticas e extracelulares (FERRERO *et al.*, 2021). Em conjunto, a ingestão de colesterol foi inversamente correlacionada com as concentrações de quatro microRNA (miR-144-3p, miR-374a-5p, miR-1277-5p e miR-1273c), cujas funções remetem a processos pró-inflamatórios (FERRERO *et al.*, 2021).

Relacionada a diversos processos metabólicos, a síntese de vitamina D pode ser modulada pelo aumento da expressão do miR-21. A atuação desse microRNA ocorre por meio da inibição dos genes que codificam a enzima 25(OH)D3-1 α -hidrolase, a qual participa da conversão da vitamina D de sua forma inativa para a forma ativa (KURA *et al.*, 2019). Nesse contexto, associação positiva foi observada entre a expressão do miR-21 e a deficiência de vitamina D na doença arterial coronariana, ao avaliar tecidos humanos provenientes da aorta (SHEANE *et al.*, 2015). Em humanos, a ingestão de vitamina D está associada a um número significativo de microRNA (por exemplo, o miR-144-3p e miR-let-7), sendo observada frequentemente relação inversa com a ingestão estimada desse nutriente (FERRERO *et al.*, 2021).

Ainda, fatores dietéticos como a ingestão de carboidratos, porções diárias de grãos inteiros e ingestão de sacarose foram associados à alteração da expressão de microRNA (GIARDINA, S.; HERNANDEZ-ALONSO, P.; DIAZ-LOPEZ, A.; SALAS-HUETOS, A.; SALAS-SALVADÓ, J.; BULLÓ *et al.*, 2019; SLATTERY *et al.*, 2017). A ingestão de carboidratos e de sacarose foi capaz de alterar, respectivamente, 250 e 198 microRNA em tecidos humanos de carcinoma de cólon quando comparado ao tecido da mucosa normal (SLATTERY *et al.*, 2017). A adoção de uma alimentação com quantidades moderadas de carboidratos e baixo índice glicêmico por indivíduos com sobrepeso ou obesidade foi capaz de reduzir as concentrações no plasma do miR-361 (GIARDINA, S.; HERNANDEZ-ALONSO, P.; DIAZ-LOPEZ, A.; SALAS-HUETOS, A.; SALAS-SALVADÓ, J.; BULLÓ *et al.*, 2019). Por outro lado, a adoção de uma dieta com quantidades moderadas de carboidratos e elevado índice glicêmico promoveu a redução das concentrações no plasma do miR-139 e miR-340 (GIARDINA, S.; HERNANDEZ-ALONSO, P.; DIAZ-LOPEZ, A.; SALAS-HUETOS, A.; SALAS-SALVADÓ, J.; BULLÓ *et al.*, 2019).

A fim de reunir evidências a respeito da associação entre microRNA circulantes, exercício, dieta e perda de peso, um estudo de revisão sistemática foi conduzido por Flowers, Won e Fukuoka (2015). Neste estudo, os dados reunidos parecem atestar a associação entre microRNA e exercício. No entanto, os autores concluem que a evidência da associação entre microRNA e dieta é fraca devido ao reduzido número de estudos (FLOWERS; WON; FUKUOKA, 2015).

Em suma, os microRNA surgem como alternativa para explicar as diferentes respostas interpessoais observadas, podendo auxiliar na redução do risco e nos tratamentos específicos para DCNT. No entanto, a relação entre a expressão de microRNA circulantes e o padrão

alimentar, com ênfase em determinados grupos alimentares, é um tópico emergente na literatura científica, sendo necessária a expansão dos estudos sobre o tema.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o perfil de expressão de microRNA no plasma e verificar a relação com biomarcadores cardiometabólicos e dieta em indivíduos adultos participantes de um estudo de base populacional ISA-Capital.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a relação entre o perfil de expressão de 21 microRNA no plasma e o perfil lipídico;
- Verificar a relação entre o perfil de expressão de 21 microRNA no plasma e biomarcadores do controle glicêmico (glicose em jejum, insulina plasmática e HOMA-IR);
- Verificar a relação entre o perfil de expressão de 21 microRNA no plasma e biomarcadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6, IL-10, proteína C reativa, TNF- α , proteína quimiotática de monócitos 1, inibidor do ativador de plasminogênio 1, adiponectina, leptina, e moléculas de adesão intercelular-1 e vascular-1);
- Verificar a interação entre o perfil de expressão de 21 microRNA e componentes alimentares que apresentam participação na redução ou aumento do risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis.

3 APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS QUE COMPOEM A TESE

O presente trabalho se configura na forma de coletânea de artigos, composta por quatro trabalhos originais, dos quais dois foram publicados em periódicos indexados. A fundamentação que norteou a concepção desses trabalhos é apresentada a seguir, e os resultados completos estão detalhadamente discutidos na seção dedicada a Resultados e Discussão.

Inicialmente, foi realizada uma busca sistemática na literatura com o propósito de identificar microRNA previamente quantificados e validados no plasma humano, que apresentassem associação com biomarcadores cardiometabólicos. A busca resultou na elaboração de uma revisão sistemática, publicada no periódico *Metabolites* (manuscrito 1), em 2022, cujo objetivo foi sintetizar as evidências das relações entre microRNA circulantes e fatores de risco para síndrome metabólica. A pesquisa serviu de fundamento para a seleção dos microRNA examinados no presente estudo.

Em seguida, tendo como base as lacunas identificadas na revisão sistemática, foi idealizado um artigo com os resultados originais. O objetivo principal do artigo foi avaliar as concentrações de 21 microRNA no plasma de indivíduos adultos, considerando os fatores de risco associados à SM. O artigo foi publicado, no ano de 2022, no periódico *Metabolites* (manuscrito 2).

A inflamação crônica é um dos pilares das alterações metabólicas relacionadas à SM. Em conjunto, o padrão dietético do indivíduo está relacionado ao desenvolvimento de fatores de risco como obesidade, dislipidemia e resistência à insulina, que por sua vez, promovem a inflamação. Nesse contexto, a fim de explorar os aspectos dietéticos relacionados à inflamação na amostra estudada, foi desenvolvido um artigo científico em colaboração com pesquisadores da Universidade de Newcastle (Inglaterra) e da Universidade da Carolina do Sul (Estados Unidos) (manuscrito 3).

Por fim, estudos têm indicado que a dieta desempenha um papel na modulação da expressão de microRNA no organismo, embora essa relação tenha sido pouco explorada. Desse modo, foi investigada a relação entre o consumo de dez grupos alimentares e a expressão plasmática de 21 microRNA. A seleção dos grupos alimentares baseou-se nas alegações de saúde e possível relação com a saúde metabólica, a resposta inflamatória e o risco de DCNT (manuscrito 4).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho trata-se de um segmento 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 projeto foi aprovado na modalidade Auxílio à Pesquisa – **Projeto Temático**, da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) (**Processo 2017/05125-7**).

O ISA-Nutrição 2015 corresponde a uma subamostra da Pesquisa de Saúde de São Paulo 2015 (ISA-Capital 2015), que foi criada 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 (FISBERG *et al.*, 2018). O ISA-Capital trata-se de um estudo transversal de base populacional realizado de forma periódica (aproximadamente, a cada cinco anos), 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).

4.1 Amostragem ISA-Nutrição 2015

O estudo ISA-Capital 2015 utilizou amostragem probabilística estratificada por sorteio em vários estágios. 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 ≥ 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).

4.2 Delineamento do estudo

O estudo em tela apresenta delineamento transversal, de base populacional, no qual foi avaliada uma subamostra de 200 indivíduos adultos, com idade de 20 a 59 anos, que participaram 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 escolha da subamostra foi realizada considerando como critérios de exclusão a presença de doenças inflamatórias agudas, câncer e o uso de medicamentos (antibióticos, anti-inflamatórios, imunomoduladores, antirretrovirais) que possam interferir nos biomarcadores de interesse. 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.

4.3 Coleta de dados

4.3.1 Dados antropométricos e de pressão arterial sistêmica

As medidas de peso, estatura e circunferência da cintura foram aferidas seguindo metodologia proposta pela Organização Mundial da Saúde e adotada pelo Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). O IMC foi calculado utilizando os valores de peso e estatura aferidos, de acordo com a fórmula (peso (kg)/altura (m)²) e o resultado analisado de acordo com a classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000). Com relação à aferição da pressão arterial, utilizou-se a técnica oscilométrica e a aferição foi verificada em triplicata, em ambos os braços, com o auxílio de aparelho automático (Omron model HEM-712C, Omron Health Care, Inc, EUA).

A determinação da SM seguiu a classificação da *International Diabetes Federation* (2005), sendo definida pela presença de pelo menos três dos cinco critérios a seguir: circunferência da cintura ≥ 80 cm para mulheres ou ≥ 90 cm para homens, HDL-c < 50 mg/dL para mulheres ou < 40 mg/dL para homens, triacilglicerois ≥ 150 mg/dL, pressão arterial sistólica ≥ 130 e diastólica ≥ 85 mmHg e glicemia em jejum ≥ 100 mg/dL. Com relação ao índice de massa corporal, utilizou-se os critérios da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000).

4.3.2 Dados dietéticos

Os dados utilizados para a avaliação do consumo alimentar foram coletados a partir da aplicação de recordatório alimentar de 24 horas (R24h) (presencialmente e por ligação telefônica) baseando-se no *Multiple Pass Method* e no *Automated Multiple Pass Method* (AMPM), respectivamente (GUENTHER *et al.*, 1995). Os dois 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 valores de energia e nutrientes oriundos dos R24h foram quantificados com o auxílio do *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, foi realizada a validação do valor nutricional dos alimentos utilizando tabelas de composição de alimentos nacionais (TACO e TBCA), sendo utilizados apenas os alimentos que obtiveram percentuais de 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).

4.3.3 Material biológico

Cerca de 30 mL de sangue foi colhido 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 coletado 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 microRNA de interesse.

4.4 Determinação de marcadores glicêmicos e lipídicos

A concentração plasmática de glicose em jejum foi determinada 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 imunoensaio multiplex, utilizando-se o *kit* LINCOpex® (Linco Research Inc., St. Charles, MO, EUA). O HOMA-IR foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

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

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 das concentrações de colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol e triacilgliceróis foi realizada por meio de métodos enzimáticos colorimétricos, utilizando-se reagentes da Cobas® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). A concentração de VLDL-colesterol (*Very-low-density lipoprotein*) foi calculada por meio da divisão da concentração de triacilgliceróis por cinco.

4.5 Determinação dos biomarcadores inflamatórios

As concentrações plasmáticas dos biomarcadores IL-1 β , IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral alfa, proteína quimiotática para monócitos-1, inibidor do ativador do plasminogênio-1, adiponectina, leptina e das moléculas de adesão solúveis intercelular-1 e vascular-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 dos biomarcadores ocorreu por meio de fluorescência, que é emitida após a ligação aos anticorpos específicos unidos a fluoróforos, seguida da reação com o anticorpo secundário marcado com ficoeritrina. 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).

4.6 Análise do perfil de expressão de microRNA

Os microRNA analisados foram selecionados após a revisão sistemática da literatura. No total, foram selecionados 21 microRNA previamente identificados em plasma humano, os quais demonstraram associação com biomarcadores glicêmicos, lipídicos, inflamatórios e excesso de peso/obesidade (Tabela 1).

Tabela 1 – MicroRNA avaliados no plasma de humanos associados ao excesso de peso, obesidade, à resposta inflamatória e ao metabolismo da glicose e de lipídios.

(Continua)

Associação	microRNA		Referências
	<i>Downregulated</i>	<i>Upregulated</i>	
Excesso de peso/obesidade	miR-130b miR-146b miR-223	miR-16 miR-140-5p miR-222 miR-376a	MA; FU; GARVEY, 2018; ORTEGA et al., 2014; PRATS-PUIG et al., 2013; ZHAO et al., 2017

Tabela 1 – MicroRNA avaliados no plasma de humanos associados ao excesso de peso, obesidade, à resposta inflamatória e ao metabolismo da glicose e de lipídios.

(Conclusão)

Associação	microRNA		Referências
	<i>Downregulated</i>	<i>Upregulated</i>	
Inflamação	miR-28-3p miR-126	miR-363 miR-486-5p	CANDIA et al., 2017; DONGHUI et al., 2019; ORTEGA et al., 2014; PRATS-PUIG et al., 2013; WANG et al., 2014; ZAMPETAKI et al., 2010
Metabolismo glicêmico	miR-15a miR-21 miR-30d miR-375	miR-30 a-5p miR-122 miR-150	JIMÉNEZ-LUCENA et al., 2018; WANG et al., 2014; ZAMPETAKI et al., 2010
Metabolismo lipídico	miR-139-3p miR-532-5p let-7c	-	GIARDINA et al., 2019; ORTEGA et al., 2014; PRATS-PUIG et al., 2013; ZHAO et al., 2017

A análise de expressão dos 21 microRNA no plasma foi realizada por real-time qPCR, utilizando BioMark™ 96.96 Fluidigm Dynamic Array (PJ1910334) no laboratório IntegraGen (Évry, França). Todas as amostras foram controladas quanto à hemólise por meio da medição de hemoglobina livre a 414 nm utilizando placa NanoQuant em um espectrofotômetro TECAN (Männedorf, Suíça). Amostras com valor de absorvância acima de 0,22 foram identificadas como hemolisadas e descartadas. O cálculo foi baseado nos resultados do estudo de Kirschner et al. (2013) realizado com microRNA característicos de hemólise: miR-16 e miR-451.

O RNA total foi extraído de 300 µL de plasma, usando kit de purificação de RNA exossômico e de circulação de plasma/soro (cat.42800) Norgen® (Thorold, ON, Canadá), seguindo o protocolo padrão do fabricante. As amostras foram enriquecidas com cel-miR-39-3p 2,7⁻⁴ µM (IDT) e o RNA foi eluído em 80 µL de tampão de eluição.

Para a transcrição reversa foram utilizados 15 µL da solução eluída de RNA e o kit miRCURY LNA RT (Cat.339340) da 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 microRNA 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 (Évry) 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 μ L 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 μ L) 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 e desnaturação a 95 °C por 10 minutos, 30 ciclos a 95 °C por 10 segundos, seguido de anelamento/extensão (60 °C, 1 minuto).

O valor do ciclo de quantificação (*Threshold Cycle* - Ct) foi definido como o número do ciclo na emissão de fluorescência que excede o de um limite fixo. Valores de Ct no intervalo de 15 a 30 foram considerados elevada expressão e valores Ct de 35 foram consideradas reduzida expressão. Valores de Ct superiores a 40 foram considerados microRNA indetectável. Os dados brutos foram expressos em Ct por amostra x ensaio microRNA. A normalização dos dados foi realizada usando o gerenciador RQ 1.2.1 e o Data Assist v3.0 da Applied Biosystems.

A média geométrica dos Cts obtidos na análise de cel-miR-39 e UniSp6 foi utilizada para normalização dos resultados, subtraindo o valor da média dos valores de Cts. A quantificação da expressão relativa dos microRNA estudados foi feita utilizando a equação, previamente estabelecida na literatura:

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*fold change*), onde $\Delta Ct = Ct$ (gene alvo) - Ct (gene de referência) e $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (amostra alvo) - ΔCt (amostra de referência).

4.7 Determinação do consumo de grupos alimentares

Foi investigado o consumo de 10 grupos de alimentos adaptados a partir do trabalho *What We Eat in America* (WWEIA) (RHODES *et al.*, 2017). Essa adaptação foi descrita anteriormente por Fisberg *et al.* (2021), com objetivo de classificar todos os alimentos consumidos pela população latino-americana e agrupá-los nos grupos de alimentos mais relevantes propostos pelo WWEIA.

De forma sucinta, o WWEIA foi desenvolvido para ser utilizado em conjunto com os dados oriundos do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) e do *Food and Nutrient Database for Dietary Studies* (FNDDS), mas vem sendo aplicado em outras populações (RHODES *et al.*, 2017). O sistema de categorização foi criado a fim de agrupar

alimentos e bebidas que são semelhantes em termos de uso e conteúdo nutricional na dieta americana (RHODES *et al.*, 2017). O banco de dados original do WWEIA contém aproximadamente 8600 itens alimentares, atribuídos a uma das 153 categorias de alimentos e organizados em 46 subgrupos e 15 categorias principais (FISBERG *et al.*, 2021; RHODES *et al.*, 2017).

As 15 categorias principais do WWEIA englobam: leite e produtos lácteos, alimentos proteicos, frutas, vegetais, grãos, pratos mistos, gorduras e óleos, petiscos e doces, açúcares, bebidas não alcoólicas, bebidas alcoólicas, água, condimentos e molhos, fórmulas infantis e comida para bebês (RHODES *et al.*, 2017). Para a adaptação das categorias do WWEIA para o contexto latino-americano, os autores avaliaram todos os alimentos consumidos em cada um dos oito países e os distribuíram em seus respectivos grupos de alimentos (FISBERG *et al.*, 2021). No caso de alimentos regionais, foram criados grupos adicionais, quando necessário, para melhor refletir as características nutricionais (FISBERG *et al.*, 2021). Foram mantidos os alimentos originais nos seus respectivos grupos, independente do consumo e disponibilidade, para manter a comparabilidade internacional. A adaptação foi verificada por um painel de especialistas (FISBERG *et al.*, 2021).

A escolha da utilização do WWEIA é fundamentada nas evidências desses itens alimentares apresentarem efeitos protetores ou nocivos para a saúde do indivíduo, relacionando-se ao desenvolvimento de DCNT (FISBERG *et al.*, 2021). Desse modo, foi avaliado o consumo dos seguintes itens alimentares: frutas, vegetais, feijões, nozes e sementes, grãos integrais, leite, peixes, carne vermelha não processada, carnes processadas e bebidas açucaradas (Tabela 2) (FISBERG *et al.*, 2021).

Tabela 2 - Descrição dos 10 grupos de alimentos avaliados em adultos brasileiros, adaptados do estudo “What We Eat in America (WWEIA)”.

(Continua)

Grupos alimentares	Descrição
Frutas	Todos os tipos de frutas, exceto suco
Vegetais	Todos os tipos de vegetais, exceto feijões e batatas
Feijões	Feijão carioca, feijão preto, grão-de-bico, ervilhas
Nozes e sementes	Amêndoas, castanha-do-brasil, amendoins, nozes e sementes
Grãos integrais	Biscoitos integrais, pães integrais, macarrão integral, arroz integral, cereais matinais, aveia
Peixe	Bacalhau, sardinhas, atum, peixes brancos, tilápia, salmão, frutos do mar (frescos e enlatados)
Leite	Leite, iogurtes, leite fermentado

Tabela 2 - Descrição dos 10 grupos de alimentos avaliados em adultos brasileiros, adaptados do estudo “What We Eat in America (WWEIA)”.

(Conclusão)	
Grupos alimentares	Descrição
Carne vermelha	Carne bovina, carne moída, costelas de carne bovina, costeletas de porco, costelas de porco, lombo de porco, exceto para aves, peixes, ovos e carnes processadas
Carnes processadas	Salsichas, salsichas <i>frankfurt</i> , nuggets, bacon, presunto, mortadela, salame, rosbife
Bebidas açucaradas	Bebidas prontas para consumo com adição de açúcar

Os grupos de alimentos foram quantificados de acordo com Rhodes et al. 2017 e Fisberg et al. 2021.

O consumo usual dos 10 grupos de alimentos foi estimado usando o método do NCI (*National Cancer Institute*) (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2023). O método consiste em duas partes, nas quais, primeiro utiliza-se regressão logística com um efeito aleatório específico do indivíduo para estimar a probabilidade de consumo, e na segunda parte, utiliza-se regressão linear em uma escala transformada com um efeito específico individual (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2023). Por fim, ambas as partes são incorporadas permitindo a correlação entre os impactos individuais específicos e adição de covariáveis compartilhadas em ambas as partes do modelo (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2023).

4.8 Determinação do índice inflamatório da dieta (*Dietary Inflammatory Index - DII*[®])

O índice inflamatório da dieta (DII[®]) foi desenvolvido para quantificar o potencial inflamatório das dietas dos indivíduos, em uma escala desde máxima anti-inflamatória (pontuação mais negativa) até máxima pró-inflamatória (pontuação mais positiva). O desenvolvimento do DII foi descrito em detalhes previamente (SHIVAPPA *et al.*, 2014). Resumidamente, o algoritmo de pontuação do DII foi baseado em uma revisão cuidadosa da literatura, por meio da qual foram selecionados 1.943 artigos e que resultou na identificação de 45 parâmetros alimentares, conforme segue: macronutrientes, incluindo categorias específicas de ácidos graxos, carboidratos e proteínas; micronutrientes, incluindo vitaminas e minerais; flavonoides; alimentos integrais e itens incluindo ervas e especiarias) (SHIVAPPA *et al.*, 2014). Esses parâmetros foram selecionados devido à existência de literatura suficientemente robusta da relação com seis biomarcadores inflamatórios: interleucinas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e proteína C reativa (SHIVAPPA *et al.*, 2014).

Para o cálculo do DII, no presente trabalho, foram utilizados os valores de autorrelato para 28 desses parâmetros alimentares: energia, carboidratos, proteínas, gordura total, gordura

saturada, colesterol, gordura trans, fibra, vitamina A, vitamina C, vitamina B12, vitamina D, vitamina B6, vitamina E, beta-caroteno, ácido fólico, ferro, magnésio, ácido graxo monoinsaturado, ácido graxo poli-insaturado, zinco, niacina, riboflavina, selênio, tiamina, chá, álcool, alho e cebola. Os 28 parâmetros alimentares utilizados foram selecionados de acordo com o consumo habitual brasileiro e na disponibilidade da composição centesimal em tabelas de composição de alimentos.

Os valores autorrelatados foram transformados em pontuações Z utilizando uma base de dados comparativa global, composta por dados de 11 países, subtraindo do valor autorrelatado do indivíduo a média da base de dados global e, posteriormente, dividindo pelo desvio padrão (SHIVAPPA *et al.*, 2014). Essas pontuações foram então convertidas em proporções (ou seja, com valores variando de 0 a 1) e centralizadas em zero, duplicando cada uma e subtraindo 1. As proporções centralizadas foram então multiplicadas por seus respectivos coeficientes (pontuações gerais de efeito inflamatório específicas dos parâmetros alimentares) para obter pontuações do DII para cada parâmetro alimentar. Por fim, as pontuações foram somadas para obter a pontuação geral do DII (SHIVAPPA *et al.*, 2014).

As pontuações do DII ajustado pela energia (E-DII) foram calculadas usando a abordagem de densidade, calculando o DII por consumo de 1.000 kcal. Isto empregou o mesmo procedimento de pontuação, contudo depende de uma base de dados de comparação global ajustada à energia (SHIVAPPA *et al.*, 2014, 2019). As pontuações DII e E-DII têm um intervalo potencial de aproximadamente -9 a +8; isto é, de minimamente a máximo pró-inflamatório, respectivamente. O DII e o E-DII são pontuados de forma semelhante e dimensionados de forma idêntica; portanto, as pontuações são comparáveis entre os estudos (SHIVAPPA *et al.*, 2019). Para este estudo, 29 dos 45 parâmetros alimentares foram utilizados para calcular a pontuação geral do DII de um indivíduo. Para o E-DII, a energia estava no denominador; então, 28 parâmetros foram usados para cálculo. A decisão de usar o DII ou E-DII foi baseada na qualidade do ajuste do modelo ou na capacidade explicativa geral do modelo.

4.9 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 (CAAE 43838621.7.0000.5421 e 003.0.162.000-08) e pela Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo (CAAE 36607614.5.0000.5421).

4.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram desenvolvidas de maneira específica para cada manuscrito e encontram-se integralmente descritas nos tópicos correspondentes.

Em síntese, a distribuição dos dados avaliados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk e histogramas. Foram aplicados testes não-paramétricos, bem como, alguns dados foram transformados em logaritmo natural quando necessário. Os dados foram apresentados em medidas de tendência central (média ou mediana), de dispersão (intervalo de confiança de 95% ou erro padrão), frequências absoluta e relativa.

Para a avaliação do perfil de expressão plasmática de microRNA no contexto da SM, os indivíduos foram distribuídos de acordo com a presença ou ausência de síndrome metabólica, quantidade de fatores de risco (0, 1-2 e ≥ 3), bem como, de acordo com a classificação do índice de massa corporal. No primeiro caso, utilizou-se teste de Mann-Whitney para amostras independentes e, para os demais, o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Para os dados categóricos foi aplicado o teste do qui-quadrado de Pearson.

Para análise do índice inflamatório da dieta (*Dietary Inflammatory Index – DII[®]*), os indivíduos foram distribuídos em quartis da pontuação do DII. A diferença entre quartis foi avaliada pelo teste de Wald ajustado com correção de Bonferroni para variáveis contínuas. O teste qui-quadrado de Pearson foi utilizado para variáveis categóricas a fim de identificar diferenças nas proporções.

A associação entre os quartis do DII ajustado para energia e biomarcadores inflamatórios e consumo de grupos de alimentos foi testada utilizando modelos de regressão linear, ajustados para a ingestão total de energia, sexo, idade e índice de massa corporal.

Todas as análises supracitadas foram realizadas considerando os pesos amostrais e o efeito de delineamento no Stata/SE e foram realizadas sob um nível de significância de 0,05.

Modelos lineares generalizados (*Generalized linear models - GLMs*) foram aplicados para examinar relações complexas entre a concentração plasmática de 21 microRNA e o consumo de 10 grupos alimentares, com o efeito de múltiplas covariáveis e considerando a

distribuição não normal de algumas variáveis. Três distribuições de probabilidade distintas - normal, gama e inversa Gaussiana - foram comparadas usando diferentes funções de ligação em um modelo GLM. O Critério de Informação de Akaike (AIC) foi empregado como critério de comparação, sendo um escore AIC menor indicativo de um melhor ajuste aos dados. Coeficientes e seus respectivos intervalos de confiança de 95% foram aplicados para estimar o impacto das covariáveis (idade, sexo e IMC), e a significância estatística das covariáveis foi determinada usando o teste de Wald. A análise foi realizada usando o software R versão 4.2.3 e o pacote *survey*, com um nível de significância estabelecido em $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Primeiro Manuscrito

Circulating microRNA related to cardiometabolic risk factors for metabolic syndrome: a systematic review

Artigo publicado no periódico *Metabolites*

Brandão-Lima PN, Carvalho GB, Payolla TB, Sarti FM, Rogero MM. Circulating microRNA Related to Cardiometabolic Risk Factors for Metabolic Syndrome: A Systematic Review. *Metabolites*. 2022 Oct 30;12(11):1044. doi: 10.3390/metabo12111044. PMID: 36355127; PMCID: PMC9692352.

Systematic Review

Circulating microRNA Related to Cardiometabolic Risk Factors for Metabolic Syndrome: A Systematic Review

Paula N. Brandão-Lima ¹, Gabrielli B. de Carvalho ¹, Tanyara B. Payolla ¹, Flavia M. Sarti ²
and Marcelo M. Rogero ^{1,*}

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

² School of Arts, Sciences and Humanities, University of Sao Paulo, 1000 Arlindo Bettio Avenue, Sao Paulo 03828-000, SP, Brazil

* Correspondence: mmrogero@usp.br

Abstract: MicroRNA regulates multiple pathways in inflammatory response, adipogenesis, and glucose and lipid metabolism, which are involved in metabolic syndrome (MetS). Thus, this systematic review aimed at synthesizing the evidence on the relationships between circulating microRNA and risk factors for MetS. The systematic review was registered in the PROSPERO database (CRD42020168100) and included 24 case-control studies evaluating microRNA expression in serum/plasma of individuals ≥ 5 years old. Most of the studies focused on 13 microRNAs with higher frequency and there were robust connections between miR-146a and miR-122 with risk factors for MetS, based on average weighted degree. In addition, there was an association of miR-222 with adiposity, lipid metabolism, glycemic metabolism, and chronic inflammation and an association of miR-126, miR-221, and miR-423 with adiposity, lipid, and glycemic metabolism. A major part of circulating microRNA was upregulated in individuals with risk factors for MetS, showing correlations with glycemic and lipid markers and body adiposity. Circulating microRNA showed distinct expression profiles according to the clinical condition of individuals, being particularly linked with increased body fat. However, the exploration of factors associated with variations in microRNA expression was limited by the variety of microRNAs investigated by risk factor in diverse studies identified in this systematic review.

Keywords: miRNA; serum; plasma; obesity; type 2 diabetes; metabolic syndrome

Citation: Brandão-Lima, P.N.; de Carvalho, G.B.; Payolla, T.B.; Sarti, F.M.; Rogero, M.M. Circulating microRNA Related to Cardiometabolic Risk Factors for Metabolic Syndrome: A Systematic Review. *Metabolites* **2022**, *12*, 1044. <https://doi.org/10.3390/metabo12111044>

Academic Editor: Daniel Oscar Cicero

Received: 12 October 2022

Accepted: 27 October 2022

Published: 30 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Dyslipidemia, high blood pressure, hyperglycemia, insulin resistance, and obesity are cardiometabolic risk factors associated with metabolic syndrome (MetS) and noncommunicable diseases (NCD) [1–4]. MetS is low-grade systemic inflammation, or meta-inflammation, meaning it comprises a metabolically triggered inflammation process [2,4,5]. This condition is related to the expansion of white adipose tissue, consisting of hypertrophy and hyperplasia of adipocytes [2,4,5]. Exposure of adipocytes to oxidative stress and overexpression of inflammatory cytokines induce cellular responses, mediated by cellular kinases, including JNK and IKK, which are related to the inactivation of the insulin receptor substrate, resulting in impaired insulin action and sensitivity, an important risk factor for MetS [5].

MicroRNA corresponds to small non-coding RNA molecules (21–23 nucleotides) that regulate numerous processes related to metabolic diseases [6]. MicroRNA mediates gene expression through post-transcriptional mechanisms [6]. Circulating microRNAs are present in extracellular fluids (e.g., plasma) and tissues and may be secreted in vesicles (exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies) or combined with proteins (argonauts—AGO, low- and high-density lipoproteins—LDL and HDL—and nucleophosmin 1—

NPM1) [7,8]. These small RNA molecules are potential biomarkers for cardiometabolic diseases and may comprise markers for investigation of NCD early risk [9,10].

Recent studies have focused on the relationship of circulating microRNA in relation to different metabolic conditions, especially obesity [11–15], type 2 diabetes (T2D) [15–18], MetS [9,19,20], and hypertension [15,21,22], which are major risk factors for the development of systemic complications [15]. In this context, evidence showed an association between miR-122 expression and increased risk for MetS and T2D [23,24]; higher plasma expression of miR-222 and fasting glucose and %HbA1c in individuals with T2D [25]; and potential use of miR-130b as a biomarker for obesity [9,10].

Considering the scarcity of evidence on the link between MetS and circulating microRNA, the investigation of connections between microRNA and diabetes, hypertension, dyslipidemia, and obesity may shed light on pathways related to MetS. In addition, circulating microRNA may present diverse patterns during various life stages; therefore, their connections with health conditions related to MetS may require different interpretations. Thus, the systematic review aimed to identify and integrate the evidence on the relationships between circulating microRNA and main risk factors for MetS in diverse life stages, highlighting the potential use of microRNA as MetS biomarkers.

2. Materials and Methods

The systematic review was prepared according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) [26], supplemented by the reporting of Meta-analyses of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) [27]. Considering that the analysis was based on evidence published in scientific studies without possibility of identification of subjects, the requirements were waived for ethical approval by Research Ethics Committee and application of informed consent. The study protocol was registered in the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) database (registration number CRD42020168100).

2.1. Search Strategy

The literature search was performed in March 2020 on Lilacs, PUBMED/Medline, Embase, Web of Science, Scopus, and ClinicalTrials.gov, and gray literature on Google Scholar. Keywords related to glycemic and lipid metabolism, inflammation, and overweight/obesity were combined using Boolean terms in the search (Supplementary Table S1). In addition, the authors performed manual search of additional studies in the references cited in eligible studies. The search strategy was performed without restriction referring to publication date or language. However, one article published in Chinese was excluded from the analysis due to limitations identified in the translation from Chinese to English.

2.2. Eligibility Criteria

The present systematic review focused on cross-sectional studies investigating MetS factors (diabetes, obesity, dyslipidemia, hypertension, and/or dyslipidemia), published in full version and including case and control groups. Considering that individuals under 5 years old should experience important developmental milestones that potentially affect microRNA expression, only studies including individuals ≥ 5 years old were included, evaluating the relationship between microRNA levels in serum/plasma and biomarkers related to glycemic and/or lipid metabolism, inflammation, and/or anthropometric variables. Eligible studies should include a control group comprising individuals without the clinical condition under investigation in the case group (healthy vs. unhealthy group). In addition, studies should include only individuals with one disease or metabolic complication (i.e., studies including individuals with multiple conditions were excluded from the analysis).

In order to minimize wide variation in circulating microRNA expression, the following studies were considered ineligible: studies focusing on the analysis of microRNA in saliva/vesicles/blood cells or including individuals with clinical complications, such as cancer, kidney disease, thyroid dysfunction, AIDS, or acute inflammatory processes.

2.3. Study Selection and Data Extraction

Three researchers (PNBL, GBC, TBP) conducted the literature search and selection stages independently: first, studies identified in the search were screened by title and abstract; in sequence, full papers of studies selected in the first stage were analyzed to check eligibility (Supplementary Table S2). Any disagreement among researchers was resolved jointly and reviewed by a fourth researcher (MMR).

The Kappa coefficient proposed by Landis and Koch [28] was used to assess the agreement between researchers in the selection stages within a range from <0 to 1 in the following categories: <0 = no agreement; 0–0.20 = poor agreement; 0.21–0.40 = fair agreement; 0.41–0.60 = moderate agreement; 0.61–0.80 = substantial agreement; and 0.81–1.00 = almost perfect agreement.

Information extracted from the studies included: country, design of study, participants' characteristics, identification of the microRNA, and quantification method; inflammatory, lipid and glycemic biomarkers, and anthropometric variables. Glycemic and lipid biomarkers were converted into mg/dL [12,21,29–34] and fasting insulin into $\mu\text{IU/mL}$.

Measures of central tendency and dispersion of circulating microRNA presented in graphs [9,12,13,16,21,30,31,33–39] were extracted using the Web Plot Digitizer software version 4.1 (Ankit Rohatgi, Austin, TX, USA). Indirect extraction methods [40,41] were applied to estimate mean and standard deviation if data were not informed in the studies [9,21,30,31,33–37].

Connections between microRNA and diseases identified in studies included in the systematic review were used to develop a complex network (graph) synthesizing the evidence obtained in the analysis. The complex network encompassed nodes of origin representing the microRNA investigated in the studies, nodes of destination representing the diseases studied, and connections between nodes (edges) representing studies that showed an association between microRNA expression and the diseases studied.

The sizes of nodes were assigned proportionally to the connections established (average degree) and the strength of connections was represented by the number of studies linking the microRNA expression and the diseases evaluated. The network was designed using the Fruchterman Reingold layout, which comprises a direct force algorithm representing nodes connected with higher intensity by proximity and presenting uniform distribution of network nodes to minimize intersections between arcs [42].

2.4. Quality Assessment of Studies

The quality of studies included in the systematic review was independently assessed by two researchers (PNBL and GBC) using the Quality Assessment Tool for Observational Cohort and Cross-Sectional Studies from the National Institutes of Health [43], which is based on 14 criteria for assessment of the study quality. Studies were categorized as good (≥ 12), fair (5–11), or poor (< 5) quality [43]. Any disagreements were resolved through discussion between the researchers and reviewed by a third researcher (MMR).

3. Results

3.1. Characteristics of Studies

The initial search identified 2446 studies, with 24 studies included in the systematic review [10,12–14,16–22,25,29,30–39]. Kappa coefficient indicated substantial agreement between researchers (0.669) in the first stage (title and abstract analysis) and almost perfect agreement (0.804) in the last stage (full-text analysis). The flowchart with details of study selection steps is presented in Figure 1.

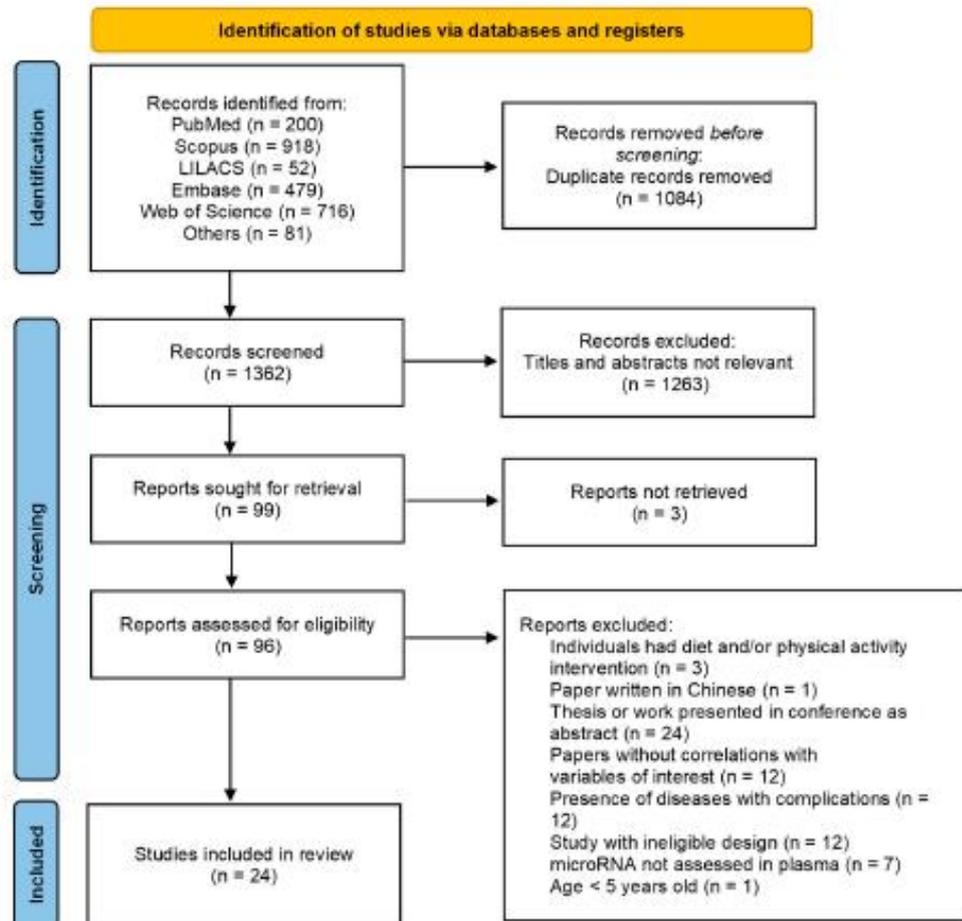


Figure 1. Flowchart of search and selection of studies in the systematic review.

The majority of studies (10 studies) was conducted in Asia: China [12,29,31,33], Taiwan [9], Japan [32], India [17,38], and Iran [16,39]. In addition, six studies were carried out in the Americas: USA [18,21,30,36], Mexico [35], and Chile [19]; and five studies were performed in Europe: Spain [10,25], Romania [34], Italy [37], and one multicentric study in Belgium, Cyprus, Estonia, Germany, Hungary, Italy, Spain, and Sweden [14]. Finally, three studies were conducted in Africa (Egypt) [13,20,22].

Overall, 1656 individuals were in the case group and 1152 individuals were in the control group. Two studies included children ≤ 10 years old [10,12], three studies included preadolescents/adolescents [13,14,19], and the remaining 19 studies included adults and older adults (Table 1).

Individuals were overweight or obese in 20 studies. Most studies reported glycemic, lipid, and anthropometric markers. Two studies did not include anthropometric variables [29,34], one study did not present body mass index (BMI) values [21], and one study did not present glycemic markers [22]. Six studies assessed inflammatory markers [10,13,16,34–36,39], mainly C-reactive protein (CRP) levels.

MicroRNAs were quantified in plasma ($n = 12$) or serum ($n = 12$) by RT-PCR and used different methods to control expression and normalize results (Table 2). Four studies informed the methodology used to control hemolysis [9,14,37,38].

Table 1. Characterization of studies included in the systematic review.

Author/Year	Country	Presence of Diseases	Pharmacological Treatment	Total Sample (M/F)	Case Group (M/F)	Control Group (M/F)	Age (Years)	BMI (kg/m ²)	General Factors	Analysis Adjustment
Children										
Cui et al., 2018 * [12]	China	Obesity	Non-medicated	172/180	98/108	74/72	5.0 ± 0.9	Overweight: 17.4 ± 0.6 Obese: 20.3 ± 2.2 Healthy controls: 15.1 ± 1.06	Without chronic or acute illness or major abnormalities	No
Prats-Puig et al., 2013 [10]	Spain	Obesity	Non-medicated	61/64	18/22	43/42	9.5 ± 1.3	Obese: 3.36 ± 0.43 Lean: -0.62 ± 0.30	No pubertal development, stable weight for height, without chronic or acute illness or major abnormalities	Age
Preadolescents and adolescents										
Krause et al., 2015 [19]	Chile	Metabolic Syndrome	Not informed	66/92 *	128 *	30 *	11.6 ± 0.9	All sample: 24.6 ± 4.0	Control group without metabolic syndrome traits	No
Iacomino et al., 2019 [14]	Eight European countries †	Obesity	Not informed	86/103	41/53	45/50	12.2 ± 1.7	Overweight/obese: 1.75 ± 0.61 NW: -0.04 ± 0.50	Unclear on the presence of diseases and use of medications	Gender, age and country
Al-Rawaf, 2018 [13]	Egypt	Obesity	Non-medicated	150/100	122/78	28/22	13.9 ± 2.9	Overweight: 21.9 ± 5.7 Obese: 26.7 ± 8.2 NW: 17.4 ± 4.3	Without chronic or acute illness or major abnormalities	Age
Adults and older adults										
Wang et al., 2015 [31]	China	Obesity	Not informed	112/118	62/61	50/57	24.0 ± 2.7	Obese: 37.73 ± 4.40 NW: 20.79 ± 1.41	Without chronic or acute illness or major abnormalities	Age, gender, HDL-c and alanine aminotransferase
Hijmans et al., 2018 [30]	USA	Obesity	Non-medicated	23/22	15/15	8/7	55.0 ± 1.4	Normal weight: 23.3 ± 1.2 Overweight: 28.2 ± 1.2 Obese: 32.3 ± 1.9	Sedentary, non-hypertensive, non-smokers, normolipidemic, without chronic or acute illness or major abnormalities	No

Wang et al., 2013 [9]	Taiwan	Metabolic syndrome	Non-medicated for hyperglycemia or hyperlipidemia	52/50	16/15	36/35	55.8 ± 8.0	With MetS: 26.6 ± 3.6 Without MetS: 24.1 ± 3.3	Without chronic or acute illness or major abnormalities	Age, gender and smoking
Zaki et al., 2019 [20]	Egypt	Metabolic Syndrome	Not informed	75/0	55/0	20/0	18–50	Not informed	Without chronic or acute illness or major abnormalities	No
Zhou et al., 2018 [29]	China	↓ HDL-c	Non-medicated	90/84	45/43	45/41	<55	Not informed	Without obesity, metabolic syndrome, chronic or acute illness or major abnormalities	Gender
Simionescu et al., 2014 [34]	Romania	Dyslipidemia Hyperglycemia	Not informed	10/15	8/12	2/3	56.2 ± 12.3	Not informed	Groups: hyperlipidemic, hyperglycemic, hyperlipidemic/hyperglycemic and control (normolipidemic/normoglycemic)	No
Badawy, Abo-Elmatty, Mesbah, 2018 [22]	Egypt	Hypertension	Anti-hypertensive medication	24/26	13/12	11/14	50.2 ± 11.0	Hypertensive: 26.7 ± 3.7 Normotensive: 27.5 ± 4.13	Included smoking	No
Hijmans et al., 2018 [21]	USA	Hypertension	Non-medicated	20/10	10/5	10/5	57.5 ± 1.6	Hypertensive: 25.8 ± 2.7 Normotensive: 25.2 ± 2.7	Sedentary, non-hypertensive, non-smokers, normolipidemic, without chronic or acute illness or major abnormalities	No
Rong et al., 2013 [33]	China	T2D	Non-medicated	94/86	47/43	47/43	48.3 ± 10.3	New-T2D: 24.58 ± 3.66 NGT: 23.38 ± 2.95	BMI < 40 and without chronic or acute illness or major abnormalities	Age, gender, BMI, smoking, alcohol drinking, history of hypertension, family history of diabetes, and specific biochemical indicators

Ortega et al., 2014 [25]	Spain	T2D Obesity	Not informed	93/0	58/0	35/0	52.1 ± 10.2	NGT/NW: 25.2 ± 1.8 T2D/NW: 26.4 ± 2.4 NGT/obese: 32.2 ± 2.4 T2D/obese: 33.4 ± 3.3	Stable metabolic control	Age, BMI
Higuchi et al., 2015 [32]	Japan	T2D	Metformin, insulin, α -glucosidase inhibitors, sulfonylureas, pioglitazone, glinides and DPP-4 inhibitors	121/83	96/59	25/24	58.4 ± 14.2	T2D: 25.9 ± 4.97 NGT: 23.6 ± 4.05	Without renal dysfunctions	Age, HbA1c, postprandial glucose, BMI, TG, HDL-c and glomerular filtration rate
Prabu et al., 2015 [38]	India	T2D	Non-medicated	74/71	48/48	26/23	44.3 ± 7.4	IGT: 24.9 ± 2.9 T2D: 25.7 ± 3.5 NGT: 24.5 ± 2.6	Newly diagnosed T2D	Gender
Lopez; Garufi; Seyhan, 2016 [36]	USA	Obesity T2D	Only one of them: metformin, sulfonylureas, Glucagon-like peptide-1 analogs and/or Dipeptidyl peptidase IV inhibitors	26/32	21/17	5/15	45.2 ± 29.5	Control/lean: 22.5 ± 3.7 Pre-T2D/lean: 21.6 ± 4.5 T2D/lean: 23.1 ± 0.6 Control/obese: 31.9 ± 8.3 Pre-T2D/obese: 41.5 ± 21.1	Without chronic or acute illness, major abnormalities or drugs/alcohol use	BMI, age and gender
Candia et al., 2017 [37]	Italy	T2D	Non-medicated	11/16	7/11	4/5	60.3 ± 8.1	NGT: 23.7 ± 3.3 IGT: 25.6 ± 3.3 T2D: 29.6 ± 7.8	Newly diagnosed T2D	No
Ghorbani et al., 2018 [39] and Mahdavi et al., 2018 € [16]	Iran	T2D Obesity	Metformin, statins, antihypertensive	39/50	26/21	13/29	52.2 ± 7.1	T2D: 28.2 ± 4.8 NGT: 27.3 ± 3.9	Without chronic or acute illness or major abnormalities	BMI, age and gender

Sucharita et al., 2018 [17]	India	T2D	Oral hypoglycemic agents	42/18	21/9	21/9	46.3 ± 7.1	T2D: 27.3 ± 4.6 NGT: 27.3 ± 4.7	Duration of disease < 5 years, without chronic or acute illness or major abnormalities	Age
Williams et al., 2019 [18]	USA	Obesity T2D	Not informed	0/67	0/44	0/23	61.3 ± 1.1	NGT: 30.5 ± 6.2 T2D: 38.1 ± 8.4	Insufficient information	No
Corona-Meraz et al., 2019 [35]	Mexico	Insulin resistance	Non-medicated	24/56	25 **	55 **	20–59	Non-IR young: 26.2 ± 5.7 Non-IR senior: 28.0 ± 4.5 IR young: 33.9 ± 7.1 IR senior: 31.1 ± 6.5	Without chronic or acute illness or major abnormalities	No

Age is presented as mean ± standard deviation or range. BMI Z-score: references [10,14]. NGT, Normal glucose tolerance; NW, Normal weight; T2D, type 2 diabetes; IR, Insulin resistance; HDL, high-density lipoprotein. * The study showed contradictory information regarding sample size, and did not report the number of M/F per group. ** The study did not report the number of M/F per group. † Cross-sectional arm. ‡ Papers with the same sample. § Belgium, Cyprus, Estonia, Germany, Hungary, Italy, Spain, and Sweden.

Table 2. Characteristics of microRNA evaluated in the papers included in the systematic review, according to disease.

Author/Year	Disease	Sample	Normalization	Regulation
			Children	
Cui et al., 2018 † [12]	Obesity	Serum	2 ^{-ΔΔCt} method, using syn-cel-miR-39 as reference	↑ miR-222, miR-486, miR-146b, miR-146a, miR-20a, miR-15b, miR-26b ↓ miR-197
Prats-Puig et al., 2013 [10]	Obesity	Plasma	ΔCt method, using miR-106a, miR-146a, miR-19b, and miR-223 as reference	↑ miR-486-5p, miR-486-3p, miR-142-3p, miR-130b, miR-423-5p, miR-532-5p, miR-140-5p, miR-16-1, miR-222, miR-363, miR-122 ↓ miR-221, miR-28-3p, miR-125b, miR-328 ↔ miR-195
			Preadolescents and adolescents	
Krause et al., 2015 [19]	Metabolic syndrome	Plasma	2 ^{-ΔΔCt} method, using syn-cel-miR-39 as reference	↑ miR-let-7e ↔ miR-126, miR-132, miR-145
Al-Rawaf, 2018 [13]	Obesity	Plasma	2 ^{-ΔΔCt} method, using cel-RNU43 as endogenous reference	↑ miR-142-3p, miR-140-5p, miR-222, miR-143, miR-130b ↓ miR-532-5p, miR-423-5p, miR-520c-3p, miR-146a, miR-15a
Iacomino et al., 2019 [14]	Obesity	Plasma	Geometric mean, using spike-in-Cel-miR-39 and SNORD95 as reference	↑ miR-501-5p, miR-551a ↓ miR-10b-5p, miR-191-3p, miR-215-5p, miR-874-3p
			Adults and older adults	

Wang et al., 2015 [31]	Obesity	Serum	Quantile algorithm (Gene Spring Software 11.0—Agent Technologies), using SYBR green as reference	↑ miR-122
Hijmans et al., 2018b [30]	Obesity	Plasma	Δ Ct method, using cel-miR-39 as reference	↓ miR-126, miR-146a, miR-150 ↑ miR-34a ↔ miR-181b
Wang et al., 2013 [9]	Metabolic syndrome	Serum	Median normalization method, using syn-cel-lin-4 as reference	↑ miR-let-7g, miR-221
Zaki et al., 2019 [20]	Metabolic Syndrome	Serum	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, using SNORD68 as reference	↑ miR-486-5p, miR-497, miR-509-5p, miR-605
Simionescu et al., 2014 [34]	Dyslipidemia Hyperglycemia	Serum	$2^{-\Delta C_t}$ method, using cel-miR-39 as reference	↑ miR-125a-5p, miR-146a, miR-10a, miR-21, miR-33a
Zhou et al., 2018 [29]	↓ HDL-c	Plasma	$2^{-\Delta C_t}$ method, using miR-191-5p as reference	↑ miR-222-3p ↓ miR-221-3p
Badawy; Abo-Elmatty; Mesbah, 2018 [22]	Hypertension	Serum	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, using miR U6 as reference	↑ miR-605, miR-623
Hijmans et al., 2018 [21]	Hypertension	Plasma	Δ Ct method, using cel-miR-39 as reference	↓ miR-21, miR-126, miR-146a ↑ miR-34a ↔ miR-17, miR-92a, miR-145, miR-150
Rong et al., 2013 [33]	T2D	Plasma	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, using miR-16 as reference	↑ miR-146a
Ortega et al., 2014 [25]	T2D Obesity	Plasma	Geometric mean method, using miR-106a, miR-146a, miR-19b, and miR-223 as reference	↑ miR-140-5p, miR-142-3p, miR-222 ↓ miR-423-5p, miR-125b, miR-192, miR-195, miR-130b, miR-532-5p, miR-126
Higuchi et al., 2015 [32]	T2D	Serum	Log 10 transformation, using <i>C. elegans</i>	↑ miR-101, miR-375, miR-802 ↔ miR-335

Prabu et al., 2015 [38]	T2D	Serum	spiked-in control miRNA and cel-miR-39 as reference 2 ^{-ΔCt} method, using RNA spike-in control (Sp6) as reference	↑ miR-128, miR-130b-3p, miR-374a-5p, miR-99b ↓ miR-423-5p ↔ miR-629a-5p, let-7d-3p, miR-142-3p, miR-484
Lopez; Garufi; Seyhan, 2016 [36]	Obesity T2D	Plasma	-ΔΔCt method, using cel-miR39, miR-191, miR-423-3p, and miR-451 as reference	↑ miR-21, miR-24.1, miR-27a, miR-34a, miR-146a, miR-148a, miR-223, miR-326, miR-152 ↓ miR-29b, miR-126, miR-155, miR-25, miR-93, miR-150
Candia et al., 2017 [37]	T2D	Plasma	2 ^(average Ct-assay Ct) and log transformed, using UniSp2, UniSp4, UniSp5, and UniSp6 as reference	↑ miR-122, miR-148, miR-99 ↓ miR-18a, miR-18b, miR-23a, miR-24, miR-27a, miR-28, miR-30d, miR-222, miR-let-7d ↔ miR-126-3p
Ghorbani et al., 2018 [39] and Mahdavi et al., 2018 [€] [16]	T2D Obesity	Serum	2 ^{-ΔCt} method, using miR-39 and miR-16 as reference	↓ miR-21, miR-155 ↔ miR-126, miR-146a
Sucharita et al., 2018 [17]	T2D	Plasma	ΔCt method, using miR-16 as reference	↑ miR-30d ↔ miR-9, miR-1, miR-133a, miR-29a, miR-143
Corona-Meraz et al., 2019 [35]	Insulin resistance	Serum	2 ^{-ΔCt} method, using hsa-miR-320a as reference	↑ miR-33a, miR-33b
Williams et al., 2019 [18]	Obesity T2D	Serum	ΔCt method, using cel-hsa-miR-221-3p as reference	↓ miR-17

T2D, type 2 diabetes; HDL, high-density lipoprotein. ↑ indicates upregulation. ↓ indicates downregulation. ↔ No differences. * Cross-sectional arm. [€] Papers with the same sample.

Regarding the diseases of interest, 86 microRNAs were investigated in T2D, obesity, dyslipidemia, hypertension, and MetS. The disease most frequently investigated in the studies was T2D, including analysis of associations with 51 microRNAs, followed by obesity (35 microRNAs) and MetS with its risk factors (20 microRNAs). Considering the studies selected in the systematic review, a major part of the studies investigated the following microRNAs: miR-146a, miR-222, miR-126, miR-130b, miR-142, miR-423, miR-21, miR-532, miR-28, miR-122, miR-140, miR-143, and miR-486 (Figure 2), being related to three or more diseases.

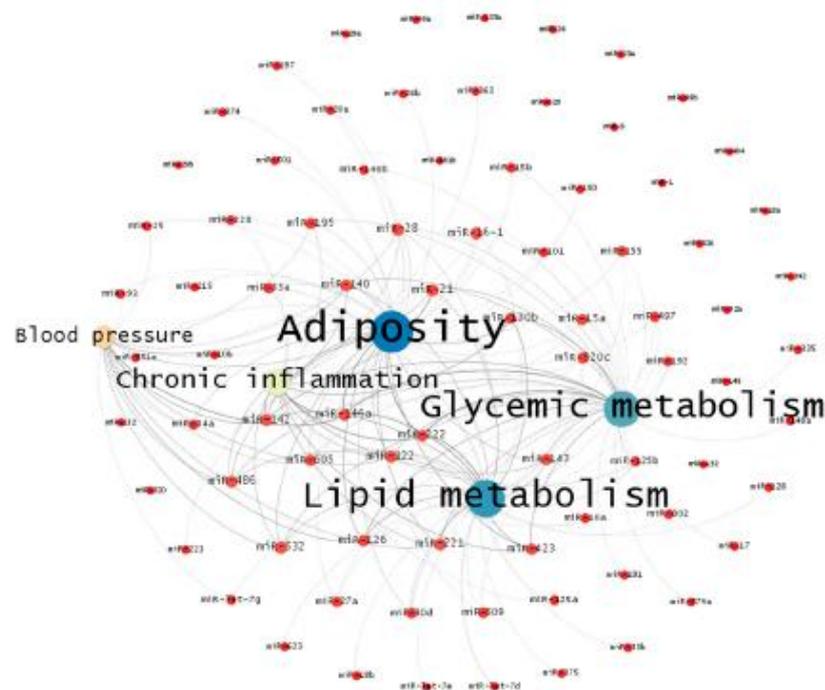


Figure 2. Network of connections between microRNA identified in studies included in the systematic literature review in relation to adiposity, chronic inflammation, blood pressure, and biomarkers related to lipid and glycemic metabolism.

The network of studies included in the systematic review showed that there was a higher number of studies linking microRNA with adiposity, lipid metabolism, and glycemic metabolism (Figure 2). Based on higher average weighted degree, robust connections between miR-146a and miR-122 were identified in relation to the conditions studied and miR-222 in relation to adiposity, lipid metabolism, glycemic metabolism, and low-grade chronic inflammation. Adiposity, lipid metabolism, and glycemic metabolism were also intensely linked to miR-126, miR-221, and miR-423. Numerous microRNAs were unconnected to health conditions investigated in the systematic review (Figure 2).

The average degree (1.791) and average weighted degree (3.988) of the graph showed that major part of the connections between nodes are still sparse and the low modularity (0.109) indicated the absence of robust structure in the network, i.e., there is a lack of groups of studies focusing on similar relationships between microRNA and the biomarkers evaluated in the systematic review. Thus, the absence of sufficient studies pairing similar microRNAs and biomarkers comprised an obstacle to perform a meta-analysis.

Specific aspects regarding microRNA expression according to risk factors and age groups are presented in subsequent sections (Table 2). Table 3 shows correlations between microRNA most frequently investigated in the selected studies and markers related to obesity, T2D, MetS, hypertension, and dyslipidemia.

Table 3. Correlations between metabolic biomarkers and main microRNAs evaluated in the papers included in the systematic review.

MicroRNA	Body Fluids	Characteristics of the Sample	Glycemic Variables	Lipid Variables	Inflammatory Variables	Anthropometric Variables	References
miR-21 *	Serum	T2D and obesity Adults and elderly	Insulin (-) HOMA-IR (-)	TC (-) HDL-c (+)	No correlations	BMI (-) WC (-)	[16,39]
	Serum	Dyslipidemia and hyperglycemia Young, adult and elderly	No correlations	TC (+) TG (+) LDL-c (+)	CRP (+) IL-1 β (+)	Not evaluated	[34]
	Plasma	T2D and obesity Adults and elderly	Glucose (+) HbA1c (+)	No correlations	IL-6 (+)	No correlations	[36]
	Plasma	Hypertension Adults and elderly	No correlations	No correlations	Not evaluated	SBP (-)	[21]
miR-28	Plasma	Newly diagnosed T2D Adults and elderly	No correlations	TC (+) LDL-c (-)	Not evaluated	No correlations	[37]
	Plasma	Obesity Children	No correlations	No correlations	CRP (-) Adiponectin (+)	BMI (-) WC (-) BP (-)	[10]
miR-122 *	Plasma	Obesity Children	No correlations	No correlations	Adiponectin (-)	BMI (+) SBP (+)	[10]
	Serum	Obesity Young	FBG (+) Insulin (+) HOMA-IR (+)	TG (+) HDL-c (-)	Not evaluated	BMI (+) BP (+)	[31]
miR-126	Plasma	Obesity Adults and elderly	No correlations	No correlations	Not evaluated	BMI (-)	[30]
	Plasma	Hypertension Adults and elderly	No correlations	No correlations	Not evaluated	SBP (-)	[21]
	Plasma	Metabolic syndrome Children	No correlations	TG (+) VLDL-c (+)	No correlations	WC (+) BMI (+)	[19]
	Plasma	T2D and obesity Adults and elderly	FBG (-) HbA1c (-)	No correlations	Not evaluated	No correlations	[25]
miR-130b *	Plasma	T2D and obesity	FBG (-)	TG (-)	Not evaluated	No correlations	[25]

		Adults and elderly	HbA1c (-)				
	Plasma	Obesity Children	HOMA-IR (+)	HDL-c (-)	CRP (+)	BMI (+) WC (+)	[10]
	Serum	Newly diagnosed T2D Adults	HbA1c (+)	No correlations	Not evaluated	No correlations	[38]
	Plasma	Overweight and obesity Adolescents	FBG (+) Insulin (+) HOMA-IR (+)	TG (+) LDL-c (+) HDL-c (+)	Adiponectin (+) Leptin (+)	BMI (+)	[13]
	Plasma	Overweight and obesity Adolescents	FBG (+) Insulin (+) HOMA-IR (+)	TG (+) LDL-c (+) HDL-c (+)	Adiponectin (+) Leptin (+)	BMI (+)	[13]
miR-140	Plasma	T2D and obesity Adults and elderly	FBG (+) HbA1c (+)	TG (+)	Not evaluated	No correlations	[25]
	Plasma	Obesity Children	No correlations	No correlations	Adiponectin (-)	BMI (+) WC (+) BP (+)	[10]
	Plasma	Overweight and obesity Adolescents	FBG (+) Insulin (+) HOMA-IR (+)	TG (+) LDL-c (+) HDL-c (+)	Adiponectin (+) Leptin (+)	BMI (+)	[13]
miR-142	Plasma	T2D and obesity Adults and elderly	FBG (+) HbA1c (+)	TG (+)	Not evaluated	No correlations	[25]
	Plasma	Obesity Children	No correlations	No correlations	CRP (+) Adiponectin (-)	BMI (+) WC (+) BP (+)	[10]
miR-143	Plasma	Overweight and obesity Adolescents	FBG (+) Insulin (+) HOMA-IR (+)	TG (+) LDL-c (+) HDL-c (+)	Adiponectin (+) Leptin (+)	BMI (+)	[13]
	Serum	Overweight and obesity Adults and elderly	No correlations	No correlations	Not evaluated	BMI (+)	[12]
miR-146a	Plasma	Obesity Adults and elderly	No correlations	No correlations	Not evaluated	BMI (-)	[30]
	Plasma	Arterial hypertension	No correlations	No correlations	Not evaluated	BP (+)	[21]

Adults and elderly						
Plasma	Overweight and obesity Adolescents	FBG (-) Insulin (-) HOMA-IR (-)	TG (+) HDL-c (+) LDL-c (+)	Adiponectin (+) Leptin (+)	BMI (-)	[13]
Plasma	T2D and obesity Adults	HOMA-B (-)	No correlations	Not evaluated	No correlations	[33]
Serum	Dyslipidemia and hyperglycemia Young, adult and elderly	No correlations	TG (+) TC (+) LDL-c (+)	CRP (+) IL-1 β (+)	Not evaluated	[34]
Plasma	Overweight and obesity Adolescents	FBG (+) Insulin (+) HOMA-IR (+)	TG (+) HDL-c (+) LDL-c (+)	Adiponectin (+) Leptin (+)	BMI (+)	[13]
Serum	Overweight and obesity Adults and elderly	No correlations	No correlations	Not evaluated	BMI (+)	[12]
Plasma	T2D and obesity Adults and elderly	FBG (+) HbA1c (+)	No correlations	Not evaluated	No correlations	[25]
Plasma	Obesity Children	HOMA-IR (+)	TG (+) HDL-c (-)	CRP (+)	BMI (+) WC (+)	[10]
Plasma	Newly diagnosed T2D Adults and elderly	HbA1c (-)	No correlations	Not evaluated	No correlations	[37]
Plasma	Reduced HDL-c Adults	No correlations	HDL (-)	Not evaluated	No correlations	[29]
Plasma	Overweight and obesity Adolescents	FBG (-) Insulin (-) HOMA-IR (-)	TG (+) LDL-c (+) HDL-c (+)	Adiponectin (+) Leptin (+)	BMI (-)	[13]
Plasma	T2D and obesity Adults and elderly	FBG (-) HbA1c (-)	TG (-)	Not evaluated	No correlations	[25]
Serum	Newly diagnosed T2D Adults	No correlations	HDL-c (-)	Not evaluated	No correlations	[38]
Plasma	Obesity Children	HOMA-IR (+)	TG (+)	No correlations	BMI (+) WC (+)	[10]
miR-486 *	Serum	Overweight and obesity	No correlations	No correlations	Not evaluated	BMI (+) [12]

Adults and elderly							
	Plasma	Obesity Children	HOMA-IR (+)	TG (+) HDL-c (-)	CRP (+) Adiponectin (-)	BMI (+) WC (+) BP (+)	[10]
	Serum	Metabolic syndrome Adults	FBG (+)	TG (+)	Not evaluated	BP (-)	[20]
	Plasma	Overweight and obesity Adolescents	FBG (-) Insulin (-) HOMA-IR (-)	TG (+) LDL-c (+) HDL-c (+)	Adiponectin (+) Leptin (+)	BMI (-)	[13]
miR-532	Plasma	T2D and obesity Adults and elderly	FBG (-) HbA1c (-)	TG (-)	Not evaluated	No correlations	[25]
	Plasma	Obesity Children	HOMA-IR (+)	TG (+)	CRP (+)	BMI (+) WC (+) BP (+)	[10]

* MicroRNA sequence -3p or -5p. FBG, fasting blood glucose. HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance. HbA1c, glycated hemoglobin. TG, triacylglycerols. VLDL, very-low-density lipoprotein. HDL, high density lipoprotein. LDL, low density lipoprotein. TC, total cholesterol. T2D, type 2 diabetes. CRP, c-reactive protein. BMI, body mass index. SBP, systolic blood pressure. BP, Blood pressure. WC, waist circumference.

3.2. Circulating microRNA Expression in Children with Obesity

Two studies [10,12] evaluated 475 children with normal weight (NW), overweight, and obesity (Table 1). Twenty-one microRNAs were assessed in serum and plasma, with fifteen upregulated and five downregulated in children with obesity (Table 2). Two of them, miR-486 and miR-222, were consistently upregulated in children with obesity in both studies included. It is important to notice that participants did not present chronic or acute illnesses and, therefore, did not use medication. Although the study of Prats-Puig et al. [10] included children with higher mean age, children in the study were not under pubertal development and the statistical analysis was adjusted by age.

Both studies showed correlations of miR-222 and miR-486 with BMI and central body adiposity [10,12] (Table 3). In addition, miR-222 and miR-486 showed correlations with HOMA-IR, adiponectin, and CRP [10] (Table 3). The detailed synthesis of the correlations is presented in Table S3.

3.3. Circulating microRNA Expression in Preadolescents and Adolescents with Obesity and Metabolic Syndrome

Three studies included evaluated plasma microRNA expression in 597 preadolescents and adolescents [13,14,19] (Table 1). The absence of other diseases associated with obesity was confirmed in only one of the studies [13]. The pubertal development stage was not mentioned in the studies.

Eight microRNAs were upregulated and nine downregulated in preadolescents/adolescents with obesity and/or MetS, with no overlap between studies [4,13,19] (Table 2). Three microRNAs (miR-126, miR-132, and miR-145) showed no differences in preadolescents/adolescents with MetS when compared with the control group without metabolic syndrome [19].

Seven microRNAs evaluated in the studies with children were replicated in preadolescents/adolescents, showing agreement in the upregulated expression of four (miR-142, miR-140, miR-222, and miR-130b). In contrast, three microRNAs (miR-532, miR-423, and miR-146a) showed downregulation in preadolescents/adolescents with obesity [13], contrarily to that reported in children with obesity [10,12].

Some upregulated microRNAs (miR-222, miR-140, miR-130) were positively associated with fasting blood glucose (FBG), insulin, and HOMA-IR values [13], while downregulated microRNAs (miR-146a, miR-532, miR-15a) were negatively associated with these variables [13] (Table 3). Positive correlations of microRNA expression were observed in relation to HDL-c, triglycerides (TG), and LDL-c levels [13].

Among the most frequently evaluated microRNAs (miR-222, miR-532, miR-146a, miR-130, miR-140), authors showed correlations with BMI [12,13], adiponectin [13], and leptin [13] levels (Tables 3 and S3). There were high levels of miR-let-7e in preadolescents with MetS, showing values twice higher in those with higher insulinemia and HOMA-IR values. The increased levels of this microRNA were correlated with a progressive increase in the number of risk factors for MetS and reduced HDL-c levels [19]. Likewise, miR-126 was positively correlated with waist circumference, BMI, and TG [19] (Tables 3 and S3).

3.4. Circulating microRNA Expression in Adults with Obesity without Metabolic Diseases Associated

The evidence showed increased levels of miR-122 and miR-34a in obese compared to normal-weight adults, whilst three microRNAs (miR-126, miR-146a and miR-150) had reduced levels (Table 2) [24,30,31]. Furthermore, expression of miR-181b showed no differences in different groups of individuals [30]. The expression of miR-122 in adults showed similar patterns in relation to results reported among obese children and the opposite was observed in relation to miR-146a.

Regarding covariates, obese adults included in the studies did not present chronic or acute illness or major abnormalities. In addition, women were not menopausal, pregnant, or breastfeeding [20,31]. Age and gender were considered in the analysis presented by one study [31]. Hijmans et al. 2018b did not include smokers and participants using medication [30].

A positive relation was observed between miR-34a and BMI, whereas miR-126, miR-146a, and miR-150 were inversely related to BMI [30]. Circulating miR-122 was positively correlated with BMI, body fat (%), blood pressure, and TG levels [31] and negatively correlated with HDL-c levels [24]. On the other hand, there were positive correlations of miR-122 [31] with FBG, insulin, and HOMA-IR values (Table 3).

3.5. Circulating microRNA in Metabolic Syndrome and Associated Factors

MetS is linked to increased central body fat, high blood pressure, insulin resistance, and changes in the lipid profile. In this context, there were increased expressions of miR-10a [34], miR-21 [34], miR-33a [34,35], miR-33b [35], miR-125a [34], and miR-146a [34] in individuals with insulin resistance and/or hyperlipidemia (Table 2). In the insulin-resistance condition, there were positive correlations of miR-33a with visceral fat, total cholesterol (TC), and TG levels [35]. Additionally, serum miR-10a, miR-21, miR-33a, miR-125a, and miR-146a levels were positively correlated with TC, TG, LDL-c, CRP, and IL-1 β levels in individuals with hyperglycemia and hyperlipidemia [34] (Tables 3 and S3).

Individuals with low HDL-c levels had decreased miR-221 levels and increased miR-222 levels compared to normolipidemic individuals [29] (Table 2). Furthermore, miR-221 was positively correlated with TC levels [19] (Tables 3 and S3).

Individuals with hypertension presented reduced levels of miR-21, miR-126, and miR-146a, whilst miR-34a was increased in hypertensive individuals [21] (Table 2). Three of the four microRNAs evaluated (miR-21, miR-126, and miR-146a) showed negative correlations with blood pressure values and only miR-34a showed positive correlation with systolic blood pressure [21]. There were no correlations between the expression of these microRNAs and other cardiometabolic biomarkers [21] (Tables 3 and S3).

Overweight/obese adults with hypertension showed increased levels of miR-605 and miR-623 [22]. There were positive correlations between TC and LDL-c levels (miR-605) and negative correlation with HDL-c levels (miR-623) [22] (Table S3).

Individuals with MetS had increased levels of miR-let-7g and miR-221 compared to individuals without MetS, expression that increased according to the presence of additional risk factors for MetS [9] (Table 2). The authors also indicated that the difference in microRNA levels was greater in women [9]. The miR-let-7g was inversely related to HDL-c levels and blood pressure values [9] (Table S3).

Elevated serum levels of miR-486, miR-497, miR-509, and miR-605 were observed in adult men with metabolic syndrome [20] (Table 2). In this condition, miR-486, miR-497, and miR-509 were positively correlated with waist circumference, FBG, and TG levels, in addition to negative correlation with blood pressure values [20]. Conversely, miR-605 was negatively correlated with waist circumference and TG levels and positively correlated with blood pressure values [20] (Table S3).

3.6. Circulating microRNA in Adults and Older Adults with Type 2 Diabetes

Twenty microRNAs showed increased levels and seventeen microRNAs showed reduced levels in individuals with T2D. Both positive and negative regulation were observed for miR-21, miR-24, miR-27a, miR-30d, miR-130b, and miR-222 (Table 2). It is important to emphasize that individuals with T2D were overweight and/or obese in the studies evaluated.

Negative correlations between levels of miR-21, miR-27a, miR-30d, and miR-155 were observed in relation to total and central body adiposity [16,37,39] (Tables 3 and S3). Only miR-101 was positively correlated with BMI in Japanese individuals with T2D [32] (Table S3).

Direct and inverse correlations between microRNA levels and glycemic variables were observed in individuals with T2D and overweight/obesity (Tables 3 and S3). FBG, insulin, HbA1c, and HOMA-IR values showed positive correlations with miR-140 and miR-142 [25,37] and were negatively associated with miR-21 [16,39], miR-126 [25], miR-146a [33], miR-423, and miR-532 [25] (Table 3).

It should be noted that positive and negative correlations were observed for miR-130b and miR-222 in the studies evaluated (Tables 3 and S3). There was a positive correlation between miR-130b and HbA1c in normoglycemic and newly diagnosed T2D adults without the use of medication [38]; however, miR-130b was negatively correlated with HbA1c in adults and older-adult men with T2D [25].

Adults and older adults with newly diagnosed T2D showed negative correlation between miR-222 and HbA1c [37], whilst adult and older-adult men with established T2D had positive correlations between miR-222 and HbA1c and FBG [25].

Increased levels of miR-130b, miR-423, and miR-532 were related to lower TG levels [25]. In contrast, increased levels of miR-140 and miR-142 were positively related to the increase in TG levels [25]. Furthermore, miR-423 was negatively correlated with HDL-c levels [38] and miR-21 showed negative correlation with total cholesterol (TC) and positive correlation with HDL-c [16,39]. On the other hand, miR-28 was positively correlated with TC and negatively correlated with LDL-c in individuals with newly diagnosed T2D without the use of medication [37] (Tables 3 and S3).

Only one study investigated the relationship between microRNA levels and inflammatory biomarkers in individuals with T2D [36]. The authors showed that miR-24 and miR-27a presented, respectively, negative and positive correlations with IL-8 levels. Furthermore, there was positive correlation between miR-34a and IL-6 level and positive correlations between miR-29b and miR-155 in relation to IL-12 levels (Table S3).

Time of T2D diagnosis may influence microRNA levels [25,37] and three studies evaluated individuals newly diagnosed with T2D who were not using antidiabetic drugs [33,37,38]. Nevertheless, some studies selected individuals with established T2D, continuous use of medication, and the use of insulin was not an exclusion factor for subjects [16,25,32,36,39]. Only one study considered that excessive alcohol consumption (>3 drinks/day) and smoking should be exclusion criteria [36].

3.7. Assessment of the Quality of Studies in the Systematic Review

In this systematic review, 24 studies presented 5 to 11 points, being categorized as fair quality [43]. The main criteria impacting the results of quality assessment were incomplete data on the population of study and the lack of sample size justification. In addition, the quality assessment tool is applicable in cross-sectional and cohort studies; therefore, some questions were not applicable to the studies included in the systematic review.

4. Discussion

The systematic review synthesized the evidence on circulating microRNAs related to risk factors for MetS in individuals ≥ 5 years old. Eleven of the thirteen microRNAs most frequently investigated were associated with lipid, anthropometric, glycemic, and inflammatory variables in individuals in different life stages. Overweight/obesity was often observed in the studies included in the systematic review, which suggests that metabolic alterations caused by the total (BMI) and central (waist circumference) adiposity may be responsible for the change in circulating microRNA levels [10,12–14,31].

The miR-130b, a potential biomarker for obesity, was related to lipid, glycemic, and inflammatory metabolism, suggesting that miR-130b may be associated with impaired metabolic control [9]. The miR-130b is secreted by adipose tissue and mediates the metabolic regulatory action of TGF- β , which acts on body energy homeostasis [9,44]. Other mechanisms related to body-weight gain are the JAK-STAT and MAPK pathways, in which the action of miR-140 is observed [45]. There was no evidence of significant

associations of miR-21 with body adiposity in humans; however, *in vitro* studies showed that miR-21 was involved both in TGF- β pathway and adipocyte differentiation [46–48].

Likewise, some microRNAs are linked to obesity-induced inflammation through pro-inflammatory pathways, such as NF- κ B and the pro-inflammatory cytokines TNF α and IL-6 [10,49–51]. Four of the studies identified relationships between the expression of circulating microRNAs (e.g., miR-21, miR-122, miR-130b, miR-142, miR-146a, miR-486, and miR-523) and the inflammatory biomarkers CRP [10,34], IL-1 β [34], IL-6 [36], adiponectin [10,13], and leptin [13]. *In vitro* studies with animal and human cells showed that the expression of miR-146a, miR-486, and miR-523 was regulated in response to the NF- κ B signaling pathway. In addition, hyperglycemia and insulin resistance may alter levels of miR-146a and miR-486 [10,49–51].

Indeed, miR-122 showed robust connections with risk factors for MetS investigated in the systematic review, in accordance with predicted target genes, highlighting its participation in lipid oxidation and hepatic synthesis of fatty acid and cholesterol [23,52]. In addition, considering the correlation with adiponectin levels, which regulate the production of TNF α and IL-6 [53], it may play an important role in inflammatory processes. Similarly, miR-126 had altered expression in obesity and may modulate CCL2 (chemokine ligand 2) through genes that encode ETS1, MAX, NFKB1, RELB, and STAT6 proteins [54–58]. The miR-126 has been consistently associated with T2D in the literature [59] and has been shown to regulate vascular integrity and angiogenesis [59] through Notch1 inhibitor delta-like 1 homolog (Dlk1) [60] and the argonaute-2 (Ago2)/Mex3a complex [61]. The interaction of miR-486 and miR-142 in the forkhead box O1 transcription factor inhibition was also identified [10] and participation with other microRNAs in the phosphatase and tensin homolog protein (PTEN) pathway and consequent activation of the PI3K/Akt [62,63].

The miR-146a showed increased levels in obese children [12], conversely to individuals with overweight/obesity in different age groups [13,30], thus, demonstrating that age may be an important factor in the evaluation of circulating microRNAs. Although the direct relationship between miR-146a and aging has not been demonstrated in the studies analyzed in the systematic review, some microRNAs may regulate cellular senescence at the post-transcriptional level. For example, in human mammary epithelial cells, miR-130b repressed p21 expression [64]. In addition, a previous study identified microRNAs (miR-142-5p, miR-222) related to the aging process through different cellular damage pathways in human serum samples [65].

Different patterns of miR-130b and miR-222 were observed in individuals with obesity, isolated or associated with T2D [25,37,38]. Increased levels of miR-130b were associated with long-term glycemic alterations (HbA1c) in adults with obesity and newly diagnosed T2D [38]. On the other hand, miR-130b levels showed negative correlations with glycemic biomarkers in adults and older adults with obesity and established T2D [25]. Similarly, miR-222 was positively correlated with elevated glycemic biomarkers in adults or older adults with T2D and inversely correlated in newly diagnosed individuals [37].

A potential explanation for the differences observed in the studies may be the initial compensatory mechanisms that precede pancreatic failure, marked by increases in insulin synthesis and release by pancreatic beta cells to re-establish glycemic homeostasis [45]. Thus, microRNA involved in beta cell mass control, insulin secretion, and signaling mechanisms respond to the glycemic imbalance conditions [66–68].

The expression levels of miR-221 were increased in individuals with MetS, being proportional to the number of risk factors for MetS [9]. Based on predicted target genes, miR-221 was related to inflammatory response, cell signaling, and insulin metabolism, presenting complementary action in relation to miR-222, since they are homologous microRNAs [29,52].

Challenges remain for the use of circulating microRNAs as biomarkers for MetS, considering that a single microRNA may be regulated by multiple factors. An important aspect to be discussed is the potential influence of medical treatments on the results (Table

1). The use of antidiabetic agents by individuals with T2D may influence the expression of circulating microRNA [25,69–71]. Results of one study included in the systematic review showed that metformin altered the plasma expression of miR-140, miR-142, and miR-222 in individuals with T2D [25]. Additionally, antihypertensives, another class of drugs largely utilized by individuals with MetS, have been associated with microRNA expression in previous studies [72,73].

Furthermore, sex may influence gene expression and microRNA regulation under different physiological conditions, due to genes linked to the X chromosome and action of sexual hormones [74–76]. Potential functional variants in the genome have been identified that may justify differential gene expression between sexes [76] and sexual dimorphism observed in some diseases [74]. It has been suggested that sex steroid hormones (e.g., estrogen) may regulate ribonucleases Droscha and Dicer and the expression of argonaute proteins, thus, indicating their role in post-transcriptional processing of microRNA [75]. However, there was an absence of evidence on differences in circulating microRNA levels due to sex in the systematic review [13,14,16,22,29,31,33,36,39].

Although a considerable number of microRNAs were assessed in studies included in the systematic review, studies were marked by high heterogeneity, with few studies identified that evaluated similar circulating microRNAs in association with the same clinical conditions.

The studies included in the systematic review adopted several strategies for normalization of microRNA expression, ranging from the use of synthetic spike-in or identification of relatively stable endogenous circulating oligonucleotides to applying an average of cycle thresholds. Some inconsistencies identified in studies screened in the systematic review might be explained by the absence of a standardized normalization method [77].

Moreover, nutritional aspects may influence the expression of circulating microRNAs, in addition to clinical and lifestyle characteristics considered in the systematic review [77] and, thus, should be considered in future studies due to their role as modifiable risk factors for the development of NCD.

5. Conclusions

Circulating microRNAs were mainly related to adiposity, lipid metabolism, and glycemic metabolism, showing distinct expression profiles according to the clinical condition of individuals. We highlighted the connections between miR-122, miR-126, miR-146a, miR-221, miR-222, and miR-423 expressions and risk factors for MetS. In addition, excess body fat was often observed in studies included in the systematic review, potentially playing a key role in circulating microRNA dysregulation.

Although there were numerous studies identified in the literature, the high heterogeneity of studies investigating the association between microRNA and MetS risk factors prevented further exploration of factors responsible for variations in microRNA expression. Therefore, further studies are required to allow for the identification of potential associations between circulating microRNAs and risk factors for MetS.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/metabo12111044/s1>, Table S1: Key terms used in database searches; Table S2: Papers excluded after full reading and reasons for exclusion; Table S3: Associations between microRNA and risk factors for metabolic syndrome.

Author Contributions: Conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, and writing—original draft preparation, P.N.B.-L., G.B.d.C., T.B.P. and M.M.R.; writing—review and editing, F.M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by São Paulo Research Foundation—FAPESP—grant number 2019/22934-1/2020/03104-5; National Council for Scientific and Technological Development—CNPq—grant number 150834/2020-9/301109/2019-2.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Malta, D.C.; Andrade, S.S.C.A.; Oliveira, T.P.; Moura, L.; Prado, R.R.; Souza, M.F.M. Probability of premature death for chronic non-communicable diseases, Brazil and Regions, projections to 2025. *Rev. Bras. Epidemiol.* **2019**, *1*, e190030. <https://doi.org/10.1590/1980-549720190030>.
2. Chait, A.; den Hartigh, L.J. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front. Cardiovasc. Med.* **2020**, *25*, 22. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00022>.
3. Kelishadi, R.; Mirmoghtadaee, P.; Najafi, K.M. Systematic review on the association of abdominal obesity in children and adolescents with cardio-metabolic risk factors. *J. Res. Med.* **2015**, *20*, 294–307.
4. Furman, D.; Campisi, J.; Verdin, E.; Carrera-Bastos, P.; Targ, S.; Franceschi, C.; Ferrucci, L.; Gilroy, D.W.; Fasano, A.; Miller, G.W.; et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 1822–1832. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>.
5. Hotamisligil, G.S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **2006**, *444*, 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature05485>.
6. Oses, M.; Sanchez, J.M.; Portillo, M.P.; Aguilera, C.M.; Labayen, I. Circulating miRNAs as Biomarkers of Obesity and Obesity-Associated Comorbidities in Children and Adolescents: A Systematic Review. *Nutrients* **2019**, *27*, 2890. <https://doi.org/10.3390/nu11122890>.
7. Cruz, K.J.C.; Oliveira, A.R.S.; Morais, J.B.S.; Severo, J.S.; Marreiro, D.N. Role of microRNA on adipogenesis, chronic low-grade inflammation, and insulin resistance in obesity. *Nutrition* **2017**, *35*, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.10.003>.
8. Quintanilha, B.J.; Reis, B.Z.; Duarte, G.B.S.; Cozzolino, S.M.F.; Rogero, M.M. Nutrigenomics: Role of microRNA and Nutrition in Modulating Inflammation and Chronic Diseases. *Nutrients* **2017**, *9*, 1168. <https://doi.org/10.3390/nu9111168>.
9. Wang, Y.; Tsai, P.; Liao, Y.; Hsu, C.Y.; Hank Juo, S.H. Circulating microRNA have a sex-specific association with metabolic syndrome. *J. Biomed. Sci.* **2013**, *4*, 72. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-20-72>.
10. Prats-Puig, A.; Ortega, F.J.; Mercader, J.M.; Moreno-Navarrete, J.M.; Moreno, M.; Bonet, N.; Ricart, W.; López-Bermejo, A.; Fernández-Real, J.M. Changes in circulating microRNA are associated with childhood obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, E1655–E1660. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1496>.
11. Ding, Y.; Sun, X.; Shan, P.F. MicroRNA and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *Biomed. Res. Int.* **2017**, *2017*, 4080364. <https://doi.org/10.1155/2017/4080364>.
12. Cui, X.; You, L.; Zhu, L.; Wang, X.; Zhou, Y.; Li, Y.; Wen, J.; Xia, Y.; Wang, X.; Ji, C.; et al. Change in circulating microRNA profile of obese children indicates future risk of adult diabetes. *Metabolism* **2018**, *78*, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.09.006>.
13. Al-Rawaf, H.A. Circulating microRNA and adipokines as markers of metabolic syndrome in adolescents with obesity. *Clin. Nutr.* **2019**, *38*, 2231–2238. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.09.024>.
14. Iacomino, G.; Russo, P.; Marena, P.; Lauria, F.; Venezia, A.; Ahrens, W.; de Henauw, S.; de Luca, P.; Foraita, R.; Günther, K.; et al. Circulating microRNA are associated with early childhood obesity: Results of the IFamily Study. *Genes Nutr.* **2019**, *9*, 2. <https://doi.org/10.1186/s12263-018-0622-6>.
15. Quiat, D.; Olson, E.E.N. MicroRNA in cardiovascular disease: From pathogenesis to prevention and treatment. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 11–18. <https://doi.org/10.1172/JCI62876>.
16. 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. *Clin. Lab* **2018**, *64*, 77–84. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2017.170618>.
17. Sucharita, S.; Ashwini, V.; Prabhu, J.S.; Avadhany, S.T.; Ayyar, V.; Bantwal, G. The Role of Circulating MicroRNA in the Regulation of Beta Cell Function and Insulin Resistance among Indians with Type 2 Diabetes. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **2018**, *22*, 770–773. https://doi.org/10.4103/ijem.IJEM_162_18.
18. Williams, A.; McDougal, D.; Jenkins, W.; Greene, N.; Williams-DeVane, C.; Kimbro, K.S. Serum miR-17 levels are downregulated in obese, African American women with elevated HbA1c. *J. Diabetes Metab. Disord.* **2019**, *9*, 173–179. <https://doi.org/10.1007/s40200-019-00404-3>.
19. Krause, B.J.; Carrasco-Wong, I.; Dominguez, A.; Arnaiz, P.; Farias, M.; Barja, S.; Mardones, F.; Casanello, P. Micro-RNAs Let7e and 126 in Plasma as Markers of Metabolic Dysfunction in 10 to 12 Years Old Children. *PLoS ONE* **2015**, *5*, e0128140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128140>.
20. Zaki, M.B.; Abulsoud, A.I.; Elsis, A.M.; Doghish, A.S.; Mansour, O.A.E.; Amin, A.I.; Elrebehy, M.A.; Mohamed, M.Y.; Goda, M.A. Potential role of circulating microRNA (486-5p, 497, 509-5p and 605) in metabolic syndrome Egyptian male patients. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* **2019**, *6*, 601–611. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S187422>.

21. Hijmans, J.G.; Diehl, K.J.; Bammert, T.D.; Kavlich, P.J.; Lincenberg, G.M.; Greiner, J.J.; Stauffer, B.L.; DeSouza, C.A. Association between hypertension and circulating vascular-related microRNA. *J. Hum. Hypertens.* **2018**, *32*, 440–447. <https://doi.org/10.1038/s41371-018-0061-2>.
22. Badawy, H.K.; Abo-Elmatty, D.M.; Mesbah, N.M. Association between serum microRNA-605 and microRNA-623 expression and essential hypertension in Egyptian patients. *Meta Gene* **2018**, *16*, 62–65. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2018.01.011>.
23. Esau, C.; Davis, S.; Murray, S.F.; Yu, X.X.; Pandey, S.K.; Pear, M.; Watts, L.; Booten, S.L.; Graham, M.; McKay, R.; et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* **2006**, *3*, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.01.005>.
24. Willeit, P.; Skrobilin, P.; Moschen, A.R.; Yin, X.; Kaudewitz, D.; Zampetaki, A.; Barwari, T.; Whitehead, M.; Ramirez, C.M.; Goedeke, L.; et al. Circulating MicroRNA-122 Is Associated With the Risk of New-Onset Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes. *Diabetes* **2017**, *66*, 347–357. <https://doi.org/10.2337/db16-0731>.
25. Ortega, F.J.; Mercader, J.M.; Moreno-Navarrete, J.M.; Rovira, O.; Guerra, E.; Esteve, E.; Xifra, G.; Martínez, C.; Ricart, W.; Rieusset, J.; et al. Profiling of Circulating MicroRNA Reveals Common MicroRNA Linked to Type 2 Diabetes That Change With Insulin Sensitization. *Diabetes Care* **2014**, *37*, 1375–1383. <https://doi.org/10.2337/dc13-1847>.
26. Page, M.J.; McKenzie, J.E.; Bossuyt, P.M.; Boutron, I.; Hoffmann, T.C.; Mulrow, C.D.; Shamseer, L.; Tetzlaff, J.M.; Akl, E.A.; Brennan, S.E.; et al. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ* **2021**, *10*, 89. <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>.
27. Stroup, D.F.; Berlin, J.A.; Morton, S.C.; Olkin, I.; Williamson, G.D.; Rennie, D.; Moher, D.; Becker, B.J.; Sipe, T.A.; Thacker, S.B. Meta-analysis of Observational Studies in Epidemiology: A Proposal for Reporting. *JAMA* **2000**, *283*, 2008–2012. <https://doi.org/10.1001/jama.283.15.2008>.
28. Landis, J.; Koch, G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **1977**, *33*, 159–174.
29. Zhou, Y.; Liu, M.; Li, J.; Wu, B.; Tian, W.; Shi, L.; Zhang, J.; Sun, Z. The inverted pattern of circulating miR-221-3p and miR-222-3p associated with isolated low HDL-C phenotype. *Lipids Health Dis.* **2018**, *16*, 188. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0842-1>.
30. Hijmans, J.G.; Diehl, K.J.; Bammert, T.D.; Kavlich, P.J.; Lincenberg, G.M.; Greiner, J.J.; Stauffer, B.L.; DeSouza, C.A. Influence of Overweight and Obesity on Circulating Inflammation-Related microRNA. *MicroRNA* **2018**, *7*, 148–154. <https://doi.org/10.2174/2211536607666180402120806>.
31. Wang, R.; Hong, J.; Cao, Y.; Juan, Shi.; Gu, W.; Ning, G.; Zhang, Y.; Wang, W. Elevated circulating microRNA-122 is associated with obesity and insulin resistance in young adults. *Eur. J. Endocrinol.* **2015**, *172*, 291–300. <https://doi.org/10.1530/EJE-14-0867>.
32. Higuchi, C.; Nakatsuka, A.; Eguchi, J.; Teshigawara, S.; Kanzaki, M.; Katayama, A.; Yamaguchi, S.; Takahashi, N.; Murakami, K.; Ogawa, D.; et al. Identification of Circulating miR-101, miR-375 and miR-802 as Biomarkers for Type 2 Diabetes. *Metab. Clin. Exp.* **2015**, *64*, 489–497. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.12.003>.
33. Rong, Y.; Bao, W.; Shan, Z.; Jun, Liu.; Xuefeng, Yu.; Xia, S.; Gao, H.; Wang, X.; Yao, P.; Hu, F.B.; et al. Increased MicroRNA-146a Levels in Plasma of Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. *PLoS ONE* **2013**, *2*, e73272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073272>.
34. Simionescu, N.; Niculescu, L.S.; Sanda, G.M.; Margina, D.; Sima, A.V. Analysis of circulating microRNA that are specifically increased in hyperlipidemic and/or hyperglycemic sera. *Mol. Biol. Rep.* **2014**, *41*, 5765–5773. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3449-2>.
35. Corona-Meraz, F.I.; Vázquez-Del Mercado, M.; Ortega, F.J.; Ruiz-Quezada, S.L.; Guzmán-Ornelas, M.O.; Navarro-Hernández, R.E. Ageing influences the relationship of circulating miR-33a and miR-33b levels with insulin resistance and adiposity. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* **2019**, *16*, 244–253. <https://doi.org/10.1177/1479164118816659.7>.
36. Lopez, Y.O.N.; Garufi, G.; Seyhan, A.A. Altered levels of circulating cytokines and microRNA in lean and obese individuals with prediabetes and type 2 diabetes. *Mol. BioSyst.* **2016**, *20*, 106–121. <https://doi.org/10.1039/c6mb00596a>.
37. Candia, P.; Spinetti, G.; Specchia, C.; Sangalli, E.; Sala, L.L.; Uccellatore, A.; Lupini, S.; Genovese, S.; Matarese, G.; Ceriello, A. A unique plasma microRNA profile defines type 2 diabetes progression. *PLoS ONE* **2017**, *4*, e0188980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188980>.
38. Prabu, P.; Rome, S.; Sathishkumar, C.; Aravind, S.; Mahalingam, B.; Shanthirani, C.S.; Gastebois, C.; Villard, A.; Mohan, V.; Balasubramanyam, M. Circulating MiRNAs of 'Asian Indian Phenotype' Identified in Subjects with Impaired Glucose Tolerance and Patients with Type 2 Diabetes. *PLoS ONE* **2015**, *28*, e0128372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128372>.
39. Ghorbani, S.; Mahdavi, R.; Alipoor, B.; Panahi, G.; Esfahani, E.N.; Razi, F.; Taghikhani, M.; Meshkani, R. Decreased serum microRNA-21 level is associated with obesity in healthy and type 2 diabetic subjects. *Arch. Physiol. Biochem.* **2018**, *124*, 300–305. <https://doi.org/10.1080/13813455.2017.1396349>.
40. Hozo, S.P.; Djulbegovic, B.; Hozo, I. Estimating the mean and variance from the median, range, and the size of a sample. *BMC Med. Res. Methodol.* **2005**, *20*, 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-5-13>.
41. Wan, X.; Wang, W.; Liu, J.; Tong, T. Estimating the sample mean and standard deviation from the sample size, median, range and/or interquartile range. *BMC Med. Res. Methodol.* **2014**, *19*, 135. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-135>.
42. Fruchterman, T.M.; Reingold, E.M. Graph drawing by force-directed placement. *Softw. Pract. Exp.* **1991**, *21*, 1129–1164.

43. National Institutes of Health. Quality Assessment Tool for Observational Cohort and Cross-Sectional Studies. 2014. Available online: <https://www.nhlbi.nih.gov/health-pro/guidelines/in-develop/cardiovascular-riskreduction/tools/cohort> (accessed on 27 September 2020).
44. Yadav, H.; Quijano, C.; Kamaraju, A.K.; Gavrilova, O.; Malek, R.; Chen, W.; Zerfas, P.; Zhigang, D.; Wright, E.C.; Stuelten, C.; et al. Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF-beta/Smad3 signaling. *Cell Metab.* **2011**, *6*, 67–79. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.04.013>.
45. Eizirik, D.L.; Pasquali, L.; Cnop, M. Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: Different pathways to failure. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2020**, *16*, 349–362. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0355-7>.
46. Joglekar, M.V.; Parekh, V.S.; Hardikar, A.A. Islet-specific microRNA in pancreas development, regeneration and diabetes. *Indian J. Exp. Biol.* **2011**, *49*, 401–408.
47. Landrier, J.F.; Derghal, A.; Mounien, L. MicroRNA in Obesity and Related Metabolic Disorders. *Cells* **2019**, *9*, 859. <https://doi.org/10.3390/cells8080859>.
48. Iacomino, G.; Siani, A. Role of microRNA in obesity and obesity-related diseases. *Genes Nutr.* **2017**, *25*, 23. <https://doi.org/10.1186/s12263-017-0577-z>.
49. Taganov, K.D.; Boldin, M.P.; Chang, K.J.; Baltimore, D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *15*, 12481–12486. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605298103>.
50. Quinn, S.R.; O'Neill, L.A. A trio of microRNA that control Toll-like receptor signalling. *Int. Immunol.* **2011**, *23*, 421–425. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxr034>.
51. Balasubramanyam, M.; Aravind, S.; Kuppan, G.; Prabu, P.; Sathishkumar, C.; Ranjani, H.; Mohan, V. Impaired miR-146a expression links subclinical inflammation and insulin resistance in Type 2 diabetes. *Mol. Cell. Biochem.* **2011**, *351*, 197–205. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0727-3>.
52. Agarwal, V.; Bell, G.W.; Nam, J.; Bartel, D.P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* **2015**, *4*, e05005. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>.
53. Zeinali, F.; Aghaei Zarch, S.M.; Jahan-Mihan, A.; Kalantar, S.M.; Vahidi Mehrjardi, M.Y.; Fallahzadeh, H.; Hosseinzadeh, M.; Rahmanian, M.; Mozaffari-Khosravi, H. Circulating microRNA-122, microRNA-126-3p and microRNA-146a are associated with inflammation in patients with pre-diabetes and type 2 diabetes mellitus: A case control study. *PLoS ONE* **2021**, *2*, e0251697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251697>.
54. Huang, W.; Lin, J.; Hongxuan, Z. miR-126: A novel regulator in colon cancer. *Biomed. Rep.* **2016**, *4*, 131–134. <http://doi.org/10.3892/br.2015.549>.
55. Rottiers, V.; Näär, A.M. MicroRNA in metabolism and metabolic disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2012**, *22*, 239–250. <https://doi.org/10.1038/nrm3313>.
56. Jansen, F.; Yang, X.; Hoelscher, M.; Cattelan, A.; Schmitz, T.; Proebsting, S.; Wenzel, D.; Vosen, S.; Franklin, B.S.; Fleischman, B.K.; et al. Endothelial microparticle-mediated transfer of MicroRNA-126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose-damaged endothelial microparticles. *Circulation* **2013**, *29*, 2026–2038. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001720>.
57. Hao, X.Z.; Fan, H.M. Identification of miRNAs as atherosclerosis biomarkers and functional role of miR-126 in atherosclerosis progression through MAPK signalling pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2017**, *21*, 2725–2733.
58. Arner, P.; Kulyte, A. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2015**, *11*, 276–288. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.25>.
59. Zampetaki, A.; Kiechl, S.; Drozdov, I.; Willeit, P.; Mayr, U.; Prokopi, M.; Mayr, A.; Weger, S.; Oberhollenzer, F.; Bonora, E.; et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNA in type 2 diabetes. *Circ. Res.* **2010**, *107*, 810–817. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.226357>.
60. Schober, A.; Nazari-Jahantigh, M.; Wei, Y.; Bidzhikov, K.; Gremse, F.; Grommes, J.; Megens, R.T.A.; Heyll, K.; Noels, H.; Hristov, M.; et al. MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 368–376. <https://doi.org/10.1038/nm.3487>.
61. Santovito, D.; Egea, V.; Bidzhikov, K.; Natarelli, L.; Mourão, A.; Blanchet, X.; Wichapong, K.; Aslani, M.; Brunßen, C.; Horckmans, M.; et al. Noncanonical inhibition of caspase-3 by a nuclear microRNA confers endothelial protection by autophagy in atherosclerosis. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *3*, eaaz2294. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaz2294>.
62. Alexander, M.S.; Casar, J.C.; Motohashi, N.; Vieira, N.M.; Eisenberg, I.; Marshall, J.L.; Gasperini, M.J.; Lek, A.; Myers, J.A.; Estrella, E.A.; et al. MicroRNA-486-dependent modulation of DOCK3/PTEN/AKT signaling pathways improves muscular dystrophy-associated symptoms. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 2651–2667. <https://doi.org/10.1172/JCI73579>.
63. Li, K.; Zhang, J.; Yu, J.; Liu, B.; Guo, Y.; Deng, J.; Chen, S.; Wang, C.; Guo, F. MicroRNA-214 suppresses gluconeogenesis by targeting activating transcriptional factor 4. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 8185–8195. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.633990>.
64. Gorospe, M.; Abdelmohsen, K. MicroRegulators come of age in senescence. *Trends Genet.* **2011**, *27*, 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.03.005>.

65. Zhang, H.; Yang, H.; Zhang, C.; Jing, Y.; Wang, C.; Liu, C.; Zhang, R.; Wang, J.; Zhang, J.; Zen, K.; et al. Investigation of MicroRNA Expression in Human Serum During the Aging Process. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2015**, *70*, 102–109. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu145>.
66. Dumortier, O.; Fabris, G.; Van Obberghen, E. Shaping and preserving beta-cell identity with microRNA. *Diabetes Obes. Metab.* **2016**, *18*, 51–57. <https://doi.org/10.1111/dom.12722>.
67. Martinez-Sanchez, A.; Rutter, G.A.; Latreille, M. miRNAs in beta-cell development, identity, and disease. *Front. Genet.* **2017**, *11*, 226. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00226>.
68. Calderari, S.; Diawara, M.R.; Garaud, A.; Gauguier, D. Biological roles of microRNA in the control of insulin secretion and action. *Physiol. Genomics* **2017**, *49*, 1–10. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00079.2016>.
69. Catanzaro, G.; Besharat, Z.M.; Chiacchiarini, M.; Abballe, L.; Sabato, C.; Vacca, A.; Borgiani, P.; Dotta, F.; Tesaro, M.; Po, A.; et al. Circulating MicroRNA in Elderly Type 2 Diabetic Patients. *Int. J. Endocrinol.* **2018**, *10*, 6872635. <https://doi.org/10.1155/2018/6872635>.
70. Wang, G.; Lin, F.; Wan, Q.; Wu, J.; Luo, M. Mechanisms of action of metformin and its regulatory effect on microRNA related to angiogenesis. *Pharmacol. Res.* **2021**, *164*, 105390. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105390>.
71. Yaribeygi, H.; Zare, V.; Butler, A.E.; Barreto, G.E.; Sahebkar, A. Antidiabetic potential of saffron and its active constituents. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 8610–8617. <https://doi.org/10.1002/jcp.27843>.
72. Solayman, M.H.; Langaee, T.Y.; Gong, Y.; Shahin, M.H.; Turner, S.T.; Chapman, A.B.; Gums, J.G.; Boerwinkle, E.; Beitelshees, A.L.; El-Hamamsy, M.; et al. Effect of plasma MicroRNA on antihypertensive response to beta blockers in the Pharmacogenomic Evaluation of Antihypertensive Responses (PEAR) studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *131*, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.02.013>.
73. Ye, H.; Ling, S.; Castillo, A.C.; Thomas, B.; Long, B.; Qian, J.; Perez-Polo, J.R.; Ye, Y.; Chen, X.; Birnbaum, Y. Nebivolol Induces Distinct Changes in Profibrosis MicroRNA Expression Compared With Atenolol, in Salt-Sensitive Hypertensive Rats. *Hypertension* **2013**, *61*, 1008–1013. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00892>.
74. Guo, L.; Zhang, Q.; Ma, X.; Wang, J.; Liang, T. miRNA and mRNA expression analysis reveals potential sex biased miRNA expression. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 39812. <https://doi.org/10.1038/srep39812>.
75. Sharma, S.; Eghbali, M. Influence of sex differences on microRNA gene regulation in disease. *Biol. Sex. Differ.* **2014**, *5*, 3. <https://doi.org/10.1186/2042-6410-5-3>.
76. Shen, J.J.; Wang, Y.F.; Yang, W. Sex-Interacting mRNA and miRNA-eQTLs and Their Implications in Gene Expression Regulation and Disease. *Front. Genet.* **2019**, *9*, 313. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00313>.
77. Santovito, D.; Weber, C. Zooming in on microRNA for refining cardiovascular risk prediction in secondary prevention. *Eur. Heart J.* **2017**, *38*, 524–528. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw259>.

5.2 Segundo Manuscrito

Circulating microRNAs Showed Specific Responses According to Metabolic Syndrome Components and Sex of Adults from a Population-Based Study

Artigo publicado no periódico *Metabolites*

Brandão-Lima PN, de Carvalho GB, Payolla TB, Sarti FM, Fisberg RM, Malcomson FC, Mathers JC, Rogero MM. Circulating microRNAs Showed Specific Responses according to Metabolic Syndrome Components and Sex of Adults from a Population-Based Study. *Metabolites*. 2022 Dec 20;13(1):2. Doi: 10.3390/metabo13010002. PMID: 36676927; PMCID: PMC9861536.

Article

Circulating microRNAs Showed Specific Responses According to Metabolic Syndrome Components and Sex of Adults from a Population-Based Study

Paula N. Brandão-Lima ¹, Gabrielli B. de Carvalho ¹, Tanyara B. Payolla ¹, Flávia M. Sarti ², Regina M. Fisberg ¹, Fiona C. Malcomson ³, John C. Mathers ³ and Marcelo M. Rogero ^{1,*}

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

² School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, 1000 Arlindo Bettio Avenue, Sao Paulo 03828-000, Brazil

³ Human Nutrition & Exercise Research Centre, Centre for Healthier Lives, Population Health Sciences Institute, Newcastle University, Newcastle upon Tyne NE2 4HH, UK

* Correspondence: mmrogero@usp.br; Tel.: +55-11-3061-7850

Citation: Brandão-Lima, P.N.; de Carvalho, G.B.; Payolla, T.B.; Sarti, F.M.; Fisberg, R.M.; Malcomson, F.C.; Mathers, J.C.; Rogero, M.M. Circulating microRNAs Showed Specific Responses According to Metabolic Syndrome Components and Sex of Adults from a Population-Based Study. *Metabolites* 2023, 13, 2. <https://doi.org/10.3390/metabo13010002>

Academic Editor: Elena Planells

Received: 10 November 2022

Revised: 14 December 2022

Accepted: 16 December 2022

Published: 20 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: microRNAs (miRNAs) regulate several metabolic pathways and are potential biomarkers for early risk prediction of metabolic syndrome (MetS). Our aim was to evaluate the levels of 21 miRNAs in plasma according to MetS components and sex in adults. We employed a cross-sectional study of 192 adults aged 20 to 59 years old from the 2015 Health Survey of São Paulo with Focus in Nutrition. Data showed reduced levels of miR-16 and miR-363 in women with MetS; however, men with one or more risk factors showed higher levels of miR-let-7c and miR-30a. Individuals with raised waist circumference showed higher levels of miR-let-7c, miR-122, miR-30a, miR-146a, miR-15a, miR-30d and miR-222. Individuals with raised blood pressure had higher miR-30a, miR-122 and miR-30a levels. Plasma levels of four miRNAs (miR-16, miR-363, miR-375 and miR-486) were lower in individuals with low HDL-cholesterol concentrations. In addition, plasma levels of five miRNAs (miR-122, miR-139, miR-let-7c, miR-126 and miR-30a) were increased in individuals with high fasting plasma glucose and/or insulin resistance. Our results suggest that the pattern of miRNA levels in plasma may be a useful early biomarker of cardiometabolic components of MetS and highlight the sex differences in the plasma levels of miRNAs in individuals with MetS.

Keywords: metabolic syndrome; abdominal obesity; dyslipidemia; hypertension; insulin resistance; miRNA

1. Introduction

Metabolic syndrome (MetS) represents a global challenge for public health, as this clustering of risk factors increases risk of mortality and the likelihood of developing type 2 diabetes, heart attack and stroke [1]. Excess of abdominal fat and insulin resistance (IR) are key factors for MetS, and both conditions are related to chronic inflammation in insulin-responsive tissues [1]. Given the complexity of MetS [1,2], the use of noninvasive biomarkers for early diagnosis may be useful as a strategy for both monitoring progress of disease and for the development of treatments.

MicroRNAs (miRNAs), a subclass of short non-coding RNAs, mediate post-transcriptional regulation of gene expression. The miRNAs function through pairing with a target messenger RNA inducing different responses according to the level of complementarity, resulting in degradation or translational repression [3,4]. In addition, some miRNAs regulate the translation of proteins, histone modifications and DNA methylation [3]. The actions of miRNAs are interconnected and overlapping since one miRNA may affect

the expression of several genes, and one gene may be a target of several miRNAs [3]. Moreover, miRNAs packaged within cell-secreted exosomes can modulate local or systemic cell-to-cell communication, and regulate several metabolic pathways [3,5,6]. It should be noted that altered miRNA levels are associated with the development of cardiometabolic risk factors [4,5].

In this context, a previous systematic review showed association of 13 miRNAs with risk factors for MetS [7]. Some miRNAs such as miR-126, miR-146a, miR-221, miR-222 and miR-423 were associated with adiposity, lipid and glycemic metabolism, and with chronic inflammation [7]. Members of the Let-7 family of miRNAs play an important role in glucose metabolism, and in the cardiovascular system [8], and their levels were associated positively with plasma LDL-c and triglyceride concentrations [9]. Furthermore, miR-16 was associated with the development of IR and MetS [6,7], while miR-30d, miR-122 and miR-139 have been associated with endothelial dysfunction and inflammatory responses [10].

MiRNA levels may be deregulated according to clinical condition of individuals; therefore, the clustering of risk factors for MetS may promote distinct expression profiles [7]. In addition, whilst it is well-known that sex is an important determinant of cardiometabolic health [11], little is known about sex differences in the levels of circulating miRNAs in individuals with MetS. Thus, the present study aims to evaluate the levels of miRNAs in plasma according to MetS components and sex in adults from a population-based study.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population and Sampling Design

The study used data from a cross-sectional population-based survey of 200 adults, aged 20 to 59 years, who were recruited as part of the 2015 Health Survey of São Paulo with Focus in Nutrition (2015 ISA-Nutrition) (Figure S1). This survey was conducted from February 2015 to February 2016, using stratified multi-stage sampling of residents from the urban area of Sao Paulo (Brazil), whose procedures were described previously [12,13]. The study was conducted in line with the Declaration of Helsinki and approved by the Research Ethics Committees of the School of Public Health, University of São Paulo. Informed written consent was obtained from all participants.

Exclusion criteria: acute inflammatory diseases, cancer or use of medication (antibiotics, anti-inflammatory drugs, immunomodulators, antiretrovirals) that may interfere with the biomarkers of interest, chronic alcoholism, use of enteral and/or parenteral diet and pregnancy/lactation.

2.2. Clinical and Metabolic Measurements

Weight, height and waist circumference (WC) were measured using standardized protocols [12]. Blood pressure was measured in triplicate in the right arm using an automatic device (Omron model HEM-712C, Omron HealthCare, Inc., Kyoto, Japan).

Blood tests were performed under fasting conditions (12–14 h), and participants were instructed to refrain from alcohol in the 72 h before, and to avoid intense physical activity.

Plasma glucose concentrations were analyzed by colorimetric enzymatic assay of glucose oxidase (Trinder reaction) (Cobas; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Plasma insulin concentrations were determined by multiplex immunoassay (LINCOplex®, Linco Research Inc., St. Charles, MO, USA). The homeostatic model assessment for IR (HOMA-IR) was calculated from fasting glucose and insulin concentrations as: $[\text{fasting glucose (mg/dL)} \times \text{fasting serum insulin } (\mu\text{IU/mL})/405]$ [14].

Serum high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-c) concentrations were measured by homogeneous enzymatic colorimetric assay and serum triacylglycerol concentrations by enzymatic colorimetric assay (glycerol phosphate peroxidase) (Cobas; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

MetS was defined by the presence of central obesity (WC \geq 80 cm for women or \geq 90 cm for men) or Body Mass Index (BMI) $>$ 30 kg/m² plus any two of the following four factors: HDL-c $<$ 50 mg/dL for women or $<$ 40 mg/dL for men, triacylglycerols \geq 150 mg/dL, systolic blood pressure \geq 130 mmHg and diastolic \geq 85 mmHg and fasting blood glucose \geq 100 mg/dL [1].

The presence of IR was defined by HOMA-IR $>$ 2.71, using the cut-off value identified by Geloneze et al. [15].

2.3. Plasma microRNA Levels Measurement

To select the miRNAs used in this study, we carried out a systematic search of the literature to identify miRNAs shown to be present in human plasma and that were associated with overweight or obesity, inflammation, glycemia and lipid metabolism [7].

Based on findings from the systematic search, we measured levels 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), using Exiqon® assays on Fluidigm® technology. Samples were controlled for hemolysis by measurement of free hemoglobin at 414 nm using a NanoQuant plate in a ZQ \u0026TECAN (Mannedorf, Switzerland) spectrophotometer.

2.3.1. RNA Extraction

Total RNA was extracted from (300 μ L) plasma using Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA Purification Kit (Slurry Format) (Norgen®, Thorold, ON, Canada, Cat. 42800). Samples were spiked with cel-miR-39-3p 2.7⁴ μ M (IDT). RNA was eluted in 80 μ L of elution buffer.

2.3.2. Reverse Transcription

Reverse transcription was performed with 15 μ L of RNA-eluted solution using miRCURY LNA RT kit (Cat. 339340, Qiagen, Marseille, France), as described in the supplier's instructions. UniSp6 RNA spike-in was included in the reverse-transcription reaction (part of Spike-in kit Cat. 339390, Qiagen, France).

2.3.3. Preamplification

Preamplification was performed using miRCURY LNA miRNA PCR Assay primers (Qiagen, France, Cat. 339306) for the 21 miRNAs plus RT UniSp6 Spike-in and Extraction Spike-in cel-miR-39. The product of reverse transcription was purified with Exonuclease I (New England Biolabs France, Paris, France, Cat. M0293).

The product of Reverse Transcription was then diluted 1/10, and 1.25 μ L of diluted cDNA was preamplified using Fluidigm PreAmp Master mix (Paris, France, Cat. 100-5580) and primer mix in 5 μ L reaction volume according to the supplier's specifications.

2.3.4. qPCR

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

Raw Ct values greater than 40 were excluded from analysis. The Δ Ct method was used for the estimation of relative levels' values. The first normalization step adjusted the raw Ct values to the recovered levels of spike-in cel-miR-39 and UniSp6 Spike-in. The second normalization step subtracted the normalized Ct for the individual sample from the mean of all individual assay for each miRNA. The fold change values calculated from

2.4. Target Gene Prediction

The targets of each miRNA were predicted using the previously validated web software TargetScanHuman 8.0 (<http://www.targetscan.org>) [16,17] and miRDB (<http://mirdb.org/>) (accessed on 07 March 2022) [18].

2.5. Statistical Analyses

The sample size was estimated based on complex sampling procedures (in two stages: census tracts and households) to obtain sufficient statistical power to represent the population of the municipality of Sao Paulo, Brazil. First, the sample was calculated to allow estimation of proportions of 0.50 with sampling error of 0.10, considering 95% confidence level and design effect of 1.5 [13]. From the initial sample, a subsample was calculated to compose the 2015 ISA-Nutrition survey, allowing estimation of proportions of 0.5, with sampling error of seven percentage points, considering 95% confidence level, and design effect of 1.5 [12]. All analyses were performed using appropriate sampling weight and complex survey procedures in Stata/SE 17.0, to ensure population-level representativeness.

The distribution of variables was assessed using histograms, and non-parametric tests were applied as data were not normally distributed. The adjusted Wald test was performed to assess differences between nested models, which provides similar outcomes to the use of likelihood ratio. The adjusted Wald test was used to compare the plasma miRNAs levels of participants grouped according to MetS status (yes/no), the number of MetS components (0, 1–2 \leq 3), the five MetS components and the IR status (yes/no). The analyses were performed for the whole sample and for each sex separately. Correction for multiple comparison was considered unnecessary, based on recommendations for analysis of data from hypothesis-generating investigations [19]. Overall, p values $<$ 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

From the sample of 200 individuals, three participants were excluded due to technical issues with miRNA quantification (PCR inhibition) and five due to hemolysis in the plasma sample. Therefore, this work evaluated findings from 192 individuals (Figure S1). The characteristics of the study cohort according to sex and number of risk factors for MetS are detailed in Table 1.

More than half of the study population were women (54.7%), presented with overweight or obesity (58.3%) and the mean age was 40 (20 to 59) years. There were significant increases in blood pressure, and in anthropometric, lipid and glycemic markers with an increasing number of factors for MetS.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of all study participants from a population-based study and for males and females separately grouped by number of metabolic syndrome (MetS) components.

Variables	All (<i>n</i> = 192)	Male (<i>n</i> = 87)			<i>p</i> -Value	Female (<i>n</i> = 105)			<i>p</i> -Value
		Number of Risk Factors for MetS				Number of Risk Factors for MetS			
		0 (<i>n</i> = 19)	1–2 (<i>n</i> = 38)	\geq 3 (<i>n</i> = 30)		0 (<i>n</i> = 10)	1–2 (<i>n</i> = 58)	\geq 3 (<i>n</i> = 37)	
Age (years)	40.2 (38.5, 42.0)	31.8 (27.8, 35.8) ^a	37.9 (34.7, 41.1) ^b	45.3 (42.4, 48.2) ^c	<0.001	36.8 (31.5, 42.0) ^a	39.6 (37.6, 41.5) ^a	47.3 (43.8, 50.8) ^b	<0.001
Weight (kg)	73.5 (70.7, 76.3)	64.8 (60.3, 69.2) ^a	79.7 (74.8, 84.5) ^b	86.3 (81.6, 91.0) ^c	<0.001	53.4 (48.9, 57.9) ^a	68.2 (63.2, 73.2) ^b	75.3 (70.3, 80.2) ^c	<0.001
Height (m)	1.67	1.74	1.76	1.73	0.196	1.63	1.59	1.58	0.443

	(1.65, 1.69)	(1.70, 1.79)	(1.73, 1.78)	(1.71, 1.75)		(1.55, 1.70)	(1.57, 1.61)	(1.55, 1.60)	
BMI (kg/m ²)	26.2 (25.4, 27.1)	21.1 (20.1, 22.2) ^a	25.6 (24.2, 26.9) ^b	28.7 (27.2, 30.2) ^c	<0.001	20.0 (19.2, 20.9) ^a	26.6 (25.2, 28.1) ^b	29.9 (28.4, 31.3) ^c	<0.001
Waist circum- ference (cm)	91.5 (89.1, 93.9)	77.2 (73.9, 80.5) ^a	92.4 (88.1, 96.7) ^b	102.8 (99.8, 105.9) ^c	<0.001	74.0 (71.3, 76.8) ^a	89.8 (85.5, 94.1) ^b	98.4 (94.5, 102.2) ^c	<0.001
SBP (mmHg)	122.7 (120.1, 125.3)	118.9 (116.0, 121.9) ^a	122.8 (118.6, 127.0) ^a	138.9 (131.6, 146.3) ^b	<0.001	104.1 (98.0, 110.2) ^a	114.0 (111.1, 116.9) ^b	132.0 (125.3, 138.7) ^c	<0.001
DBP (mmHg)	75.6 (73.9, 77.3)	68.9 (66.5, 71.3) ^a	74.7 (71.3, 78.0) ^b	84.8 (79.8, 89.8) ^c	<0.001	65.8 (61.2, 70.5) ^a	72.8 (70.8, 74.8) ^b	81.3 (76.5, 86.2) ^c	<0.001
HDL-c (mg/dL)	45.4 (43.2, 47.7)	55.3 (50.2, 60.4) ^a	43.5 (39.0, 48.0) ^b	36.5 (31.3, 41.7) ^c	<0.001	59.3 (54.4, 64.1) ^a	48.7 (44.9, 52.5) ^b	38.9 (35.9, 41.9) ^c	<0.001
Triacylglyc- erol (mg/dL)	119.1 (105.9, 132.3)	65.6 (49.9, 81.3) ^a	112.3 (92.9, 131.8) ^b	217.4 (175.9, 258.9) ^c	<0.001	53.1 (41.9, 64.3) ^a	92.2 (80.9, 103.5) ^b	145.5 (125.8, 165.1) ^c	<0.001
Plasma glu- cose (mg/dL)	101.6 (96.6, 106.5)	86.4 (83.4, 89.5) ^a	93.0 (90.6, 95.3) ^b	134.2 (109.9, 158.4) ^c	<0.001	87.1 (84.0, 90.2) ^a	92.3 (89.3, 95.3) ^b	115.8 (103.2, 128.5) ^c	<0.001
Plasma insu- lin (μUI/mL)	13.1 (11.4, 14.8)	5.7 (3.9, 7.4) ^a	11.9 (8.3, 15.5) ^b	22.2 (15.7, 28.6) ^c	<0.001	5.5 (4.4, 6.7) ^a	10.7 (9.0, 12.4) ^b	18.5 (14.5, 22.5) ^c	<0.001
HOMA-IR	3.5 (2.9, 4.1)	1.2 (0.8, 1.6) ^a	2.7 (1.9, 3.6) ^b	7.0 (4.8, 9.1) ^c	<0.001	1.2 (0.9, 1.4) ^a	2.4 (2.0, 2.8) ^b	5.8 (4.2, 7.4) ^c	<0.001

Data are presented as means with 95% confidence interval (in parenthesis). Different letters denote difference between groups for each sex separately as assessed by the adjusted Wald test. Bold values indicate statistical significance at the $p < 0.05$ level. SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure.

For both males and females, individuals in the MetS group with ≥ 3 risk factors had the highest means for all clinical variables, except height which did not differ between MetS groups. MetS was observed in 30.3% of individuals, with large WC (68%) and low HDL-c concentrations (52%) being the most prevalent risk factors (Figure 1).

There were no differences in miRNA levels according to MetS status in the whole cohort. However, when separated by sex, there were reduced levels of miR-16 (Figure 2A) and miR-363 (Figure 2B) in plasma from women with MetS in comparison with women without MetS ($p < 0.05$).

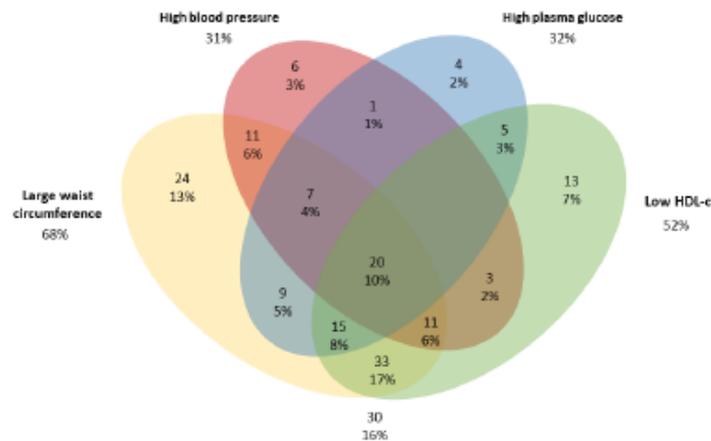


Figure 1. Venn diagram of components of the metabolic syndrome (MetS) in adults from a population-based study in urban Brazil ($n = 192$). The cut-offs were: large waist circumference (≥ 80 cm for women or ≥ 90 cm for men); Low HDL-c (< 50 mg/dL for women or < 40 mg/dL for men); high blood pressure (systolic pressure ≥ 130 and diastolic pressure ≥ 85 mmHg) and High plasma glucose ≥ 100 mg/dL [1].

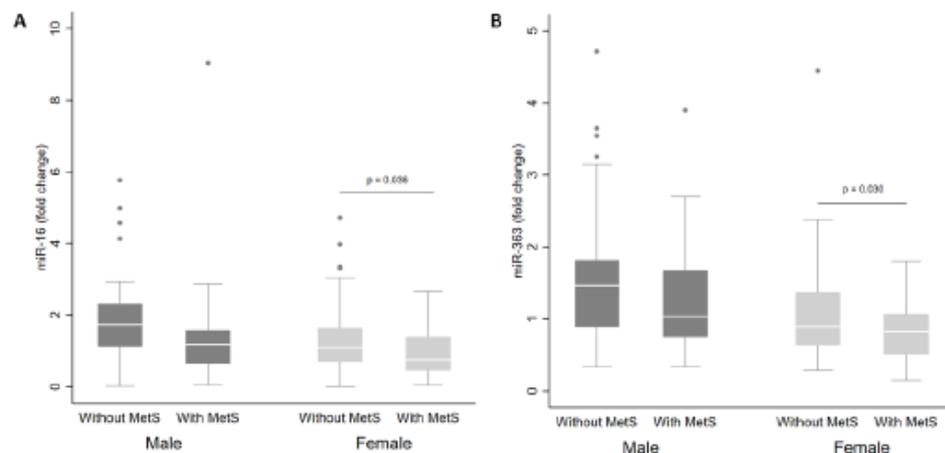


Figure 2. Levels of miR-16 (A) and miR-363 (B) in plasma from adults according to sex and metabolic syndrome (MetS) status. The sample sizes were as follows: male (without MetS $n = 57$ | MetS $n = 30$); female (without MetS $n = 70$ | MetS $n = 35$). The comparisons of levels in individuals with and without MetS by sex were conducted using the adjusted Wald test. The box plots depict the 25th–75th percentile, and the white line represents the median for each group. $p < 0.05$ indicates statistically significant differences.

Levels of miRNAs in plasma from the whole cohort, and for males and females separately according to the number of risk factors for MetS (0, 1–2 and ≥ 3), are presented in Table 2. Men in the groups with 1–2 and ≥ 3 risk factors had higher levels of miR-let-7c and miR-30a than those in the group without risk factors ($p = 0.003$ and $p = 0.029$, respectively). In women, miR-150 levels were higher in the group with 1–2 risk factors in comparison with the group without risk factors ($p = 0.029$).

Table 2. Levels of 21 miRNAs in plasma for all study participants from a population-based study and for males and females separately grouped by number of metabolic syndrome (MetS) components.

Fold Change	Total (n = 192)	Male (n = 87)			p-Value	Female (n = 105)			p-Value
		Number of Risk Factors for MetS				Number of Risk Factors for MetS			
		0	1–2	≥3		0	1–2	≥3	
miR-15a	1.2 (1.1, 1.3)	1.2 (0.9, 1.6)	1.5 (1.2, 1.8)	1.2 (1.0, 1.5)	0.232	0.9 (0.6, 1.2)	1.0 (0.9, 1.2)	1.0 (0.8, 1.1)	0.857
miR-16	1.4 (1.2, 1.6)	1.9 (1.3, 2.4)	1.7 (1.3, 2.0)	1.4 (0.7, 2.2)	0.659	1.0 (0.7, 1.4)	1.3 (1.1, 1.5)	0.9 (0.7, 1.2)	0.068
miR-21	1.38 (1.19, 1.58)	1.2 (0.6, 1.8)	1.6 (1.1, 2.2)	1.4 (0.9, 1.8)	0.567	1.2 (0.8, 1.6)	1.3 (1.0, 1.6)	1.0 (0.8, 1.3)	0.414
miR-28-3p *	1.61 (1.34, 1.88)	1.5 (0.6, 2.3)	1.7 (1.1, 2.4)	1.6 (1.1, 2.2)	0.884	1.1 (0.6, 1.6)	1.6 (1.1, 2.2)	1.3 (0.8, 1.8)	0.397
miR-30a-5p	1.1 (1.0, 1.2)	1.0 (0.8, 1.1) ^a	1.3 (1.0, 1.5) ^b	1.5 (1.1, 2.0) ^b	0.029	1.0 (0.6, 1.5)	0.9 (0.8, 1.0)	1.0 (0.8, 1.2)	0.633
miR-30d	1.3 (1.1, 1.5)	1.16 (0.83, 1.50)	1.5 (1.1, 2.0)	1.6 (1.0, 2.1)	0.528	0.9 (0.5, 1.2)	1.2 (0.9, 1.5)	1.1 (0.8, 1.4)	0.316
miR-122	1.9 (1.3, 2.5)	1.3 (0.8, 1.8)	1.8 (1.2, 2.4)	3.8 (1.5, 6.0)	0.071	1.0 (0.6, 1.4)	1.3 (0.6, 2.1)	2.2 (0.1, 4.3)	0.488
miR-126	1.2 (1.1, 1.3)	1.1 (0.6, 1.5)	1.3 (1.0, 1.5)	1.5 (0.9, 2.1)	0.468	1.0 (0.8, 1.3)	1.1 (0.9, 1.3)	1.2 (0.9, 1.4)	0.827
miR-130b [⋄]	1.3 (1.2, 1.5)	1.6 (1.1, 2.0)	1.4 (1.1, 1.8)	1.3 (0.9, 1.6)	0.566	1.1 (0.5, 1.7)	1.3 (1.0, 1.6)	1.0 (0.8, 1.3)	0.292
miR-139-3p [⋄]	0.4 (0.4, 0.5)	0.4 (0.3, 0.5)	0.5 (0.3, 0.6)	0.4 (0.3, 0.6)	0.603	0.6 (0.1, 1.1)	0.4 (0.3, 0.5)	0.4 (0.2, 0.5)	0.772
miR-140-5p [⋄]	1.1 (1.0, 1.3)	1.3 (0.7, 1.8)	1.2 (0.9, 1.5)	1.1 (0.8, 1.5)	0.925	0.6 (0.3, 0.9)	1.1 (0.8, 1.4)	1.1 (0.8, 1.4)	0.05
miR-146a	1.5 (1.3, 1.8)	1.3 (0.5, 2.0)	1.9 (1.3, 2.5)	1.6 (1.1, 2.2)	0.384	1.0 (0.6, 1.5)	1.5 (1.1, 1.8)	1.3 (0.9, 1.8)	0.334
miR-150	1.2 (1.0, 1.4)	1.5 (0.7, 2.3)	1.2 (0.9, 1.5)	1.3 (1.0, 1.7)	0.793	0.8 (0.7, 0.9) ^a	1.3 (0.9, 1.6) ^b	1.0 (0.8, 1.2) ^{ab}	0.029
miR-222 ^{**}	1.3 (1.2, 1.5)	1.0 (0.5, 1.5)	1.7 (1.1, 2.3)	1.6 (0.9, 2.3)	0.114	1.0 (0.7, 1.2)	1.3 (1.0, 1.6)	1.1 (0.8, 1.4)	0.275
miR-223 ^{**}	1.7 (1.4, 2.0)	1.9 (0.8, 3.0)	1.7 (1.46, 2.24)	1.46 (1.03, 1.89)	0.884	1.4 (0.5, 2.3)	1.9 (1.3, 2.4)	1.2 (0.88, 1.7)	0.173
miR-363 ^{**}	1.2 (1.1, 1.3)	1.4 (1.0, 1.9)	1.5 (1.2, 1.8)	1.3 (1.0, 1.6)	0.542	0.9 (0.6, 1.2)	1.0 (0.8, 1.3)	0.8 (0.6, 0.9)	0.095
miR-375	1.4 (1.1, 1.7)	1.3 (1.0, 1.7)	1.4 (1.0, 1.8)	1.4 (0.8, 2.1)	0.965	1.9 (0.9, 3.0)	1.6 (0.9, 2.2)	1.0 (0.7, 1.3)	0.092
miR-376a	1.9 (1.5, 2.3)	1.5 (0.4, 2.7)	2.5 (1.5, 3.4)	2.2 (0.7, 3.7)	0.448	1.4 (0.4, 2.3)	1.8 (1.3, 2.3)	1.5 (0.9, 2.0)	0.622
miR-486-5p	1.2 (1.1, 1.3)	1.4 (1.0, 1.9)	1.4 (1.2, 1.7)	1.3 (0.9, 1.7)	0.767	1.0 (0.7, 1.2)	1.0 (0.9, 1.2)	0.9 (0.7, 1.0)	0.194
miR-532-5p [⋄]	1.3 (1.1, 1.1)	1.6 (0.8, 2.5)	1.5 (1.1, 1.8)	1.3 (1.0, 1.7)	0.758	1.0 (0.6, 1.5)	1.2 (0.9, 1.5)	0.9 (0.7, 1.2)	0.388
miR-let-7c	1.31 (1.13, 1.49)	0.8 (0.5, 1.1) ^a	1.6 (1.0, 2.1) ^b	1.7 (1.3, 2.1) ^b	0.003	1.0 (0.8, 1.2)	1.0 (0.9, 1.2)	1.2 (0.9, 1.5)	0.423

* n = 190 (87M/103F); [⋄] n = 190 (86M/104F); [⋄] n = 142 (66M/76F); [⋄] n = 177 (82M/95F); ^{**} n = 191 (87M/104F); [⋄] n = 185 (84M/101F). Data are presented in mean with 95% confidence interval (in

parenthesis). Different letters denote difference between groups in each gender assessed by adjusted Wald test. Bold values indicate statistical significance at the $p < 0.05$ level.

Next, we examined miRNA levels according to each component of the MetS. We observed that levels of miR-let-7c ($p = 0.003$) and miR-122 ($p = 0.019$) in plasma were higher in those with large WC (Figure 3A,B). In addition, large WC was associated with increased levels of miR-let-7c, miR-122 and miR-30a in men (Table 3). However, for women with large WC, plasma levels of miR-146a, miR-15a, miR-30d and miR-222 were increased (Table 3).

Table 3. Altered levels of miRNAs according to sex and individual components of the metabolic syndrome (MetS) in adults from a population-based study.

miRNA	Sex	Plasma Levels	Lev-Potential Target	Function	MetS Components	<i>p</i> -Value					
miR-let-7c	Male	Up	<i>CDK8</i>	Regulate transcription factors (SREBP, STAT1) and RNA polymerase II	Large WC	0.015					
			<i>MAP family</i>	Cell signaling (e.g., c-Jun)							
			<i>IGF2BP</i>	Nutrient metabolism							
			<i>RFX6</i>	Regulate beta-cell maturation and function							
			<i>IL10</i>	ERK1/2, p38 and NF- κ B signaling							
			<i>SOCS1/4</i>	Negative feedback on cytokine signaling							
miR-122	Male	Up	<i>CCL3</i>	Acute inflammatory state	Large WC High blood pressure	0.015 0.021					
			<i>PRKAR2A</i>	PKA activation							
			<i>PRKRA</i>	Response to stress							
			<i>PDK4</i>	Regulate general metabolism							
			miR-15a	Female			Up	<i>SIRT4</i>	Mitochondrial functions	Large WC	0.041
								<i>AKT3</i>	Cell signaling		
<i>PDK4</i>	Regulate general metabolism										
miR-16	Male	Down	<i>VEGFA</i>	Cell proliferation and migration, apoptosis, permeabilization	High triacylglycerol	0.038					
			<i>IKBKB</i>	Activation of NF- κ B							
			<i>CDK8</i>	Regulate transcription factors (SREBP, STAT1) and RNA polymerase II							
miR-222	Female	Up	<i>FOXO1</i>	Regulate adipocytokines and insulin signaling	Large WC	<0.001					
			<i>BCL2</i>	Regulate cell death							
			<i>SOCS3/5</i>	Negative feedback of cytokine signaling							
miR-146a	Female	Up	<i>PIK3R1</i>	Insulin metabolism	Large WC	0.046					
			<i>CDK8</i>	Regulate transcription factors (SREBP, STAT1) and RNA polymerase II							
			<i>MAP3K2</i>	Cell signaling (NF- κ B pathway)							
			<i>IGF1</i>	ERK signaling							
			<i>TRAF6</i>	Activated TLR4 signaling, Toll-Like receptor Signaling Pathways, NF- κ B activation							
			<i>PRKAA2</i>	mTOR signaling, AMPK Signaling Pathway, Insulin signaling							
miR-30d	Female	Up	<i>MARK1</i>	Energy metabolism	Large WC	0.047					
			<i>SOCS1/3</i>	Negative feedback on cytokine signaling							
			<i>RFX6</i>	Regulate beta-cell maturation and function							
			<i>RUNX2</i>	Regulates osteogenesis and adipogenesis							

miR-30a	Male	Up	<i>UCP3</i>	Protects mitochondria against lipid-induced oxidative stress	Large WC	0.015
			<i>PPARGC1A</i>	Energy metabolism/blood pressure control, cellular cholesterol homeostasis		
			<i>SOCS3</i>	Negative feedback on cytokine signaling	High blood pressure	0.001
			<i>MAP3K</i>	Cell signaling (e.g., c-Jun)		
			<i>IRS1/2</i>	Insulin signaling pathway		
<i>PRKARIA</i>	PKA activation					
miR-139	Female	Down	<i>GSK3A</i>	Regulates glycogen synthase, PI3K signaling pathways, transcription factors (e.g., c-Jun)	High FG	0.016
			<i>AKT1S1</i>	Glucose metabolism, mTOR and MAPK signaling		
			<i>PIK3R4</i>	Insulin and ERK/MAPK signaling		
			<i>IL10</i>	Inflammation		
miR-363	Male	Down	<i>MARK1</i>	Glucose metabolism	Low HDL-c	0.026
			<i>TRAF3</i>	Toll-like receptor (TLR3 and TLR4) cascade, TNF signaling		
			<i>MAPK8</i>	TLR4, TNF and IL-2 pathways		
			<i>NOTCH1</i>	Notch signaling pathway		
miR-486	Male	Down	<i>MAP3K7</i>	Cell signaling (e.g., c-Jun)	Reduced HDL-c	0.012
			<i>PIK3R1</i>	Insulin metabolism		
			<i>MARK1</i>	Glucose metabolism		
			<i>IGF1</i>	ERK signaling		

Adjusted Wald test was used to assess differences in miRNA levels for males and females separately and according to individual components of the MetS. $p < 0.05$ indicates statistically significant differences. Genes that are targeted by individual miRNA were predicted using the previously validated web software TargetScanHuman 8.0 and miRDB.

In addition, there were higher levels of miR-122 ($p = 0.045$) and lower levels of miR-139 ($p = 0.033$) in individuals with high fasting glucose (Figure 3C,D). Only miR-139 showed reduced plasma levels in women (Table 3). Levels of miR-30a in plasma were increased in individuals with high blood pressure ($p = 0.005$) and levels of miR-122 and miR-30a were increased in men with high blood pressure (Table 3).

Regarding low HDL-c concentrations, lower levels of miR-16 ($p = 0.036$), miR-363 ($p = 0.017$), miR-375 ($p = 0.041$) and miR-486 ($p = 0.01$) were observed in the whole cohort (Figure 4). However, when the data were examined for males and females separately, reduced levels were detected for miR-16, miR-363 and miR-486 in men only (Table 3). Further, lower levels of miR-16 were observed in men with high triacylglycerol concentrations (Table 3).

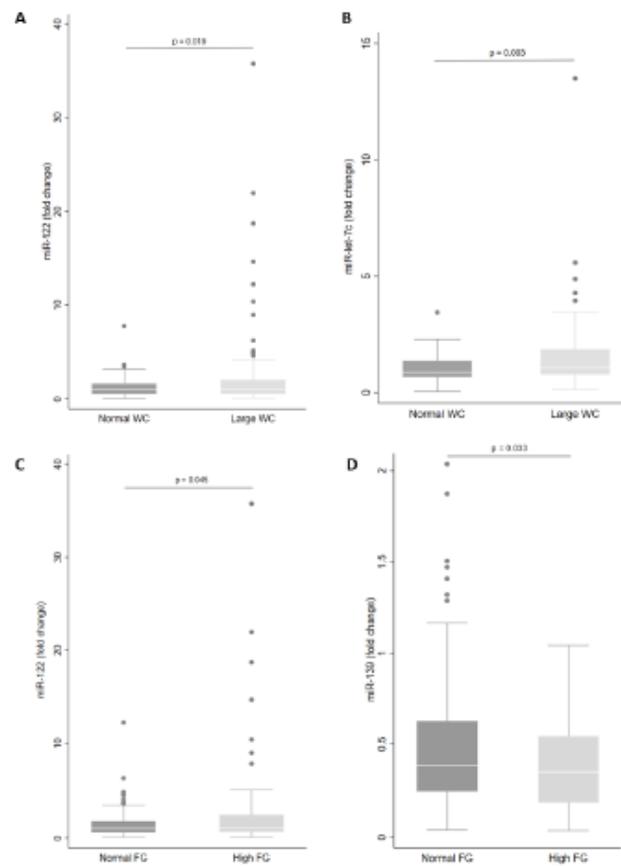


Figure 3. Levels of miRNA in plasma according to waist circumference (WC) (A,B) and fasting glucose (FG) status (C,D). The sample sizes were as follows: miR-122 and miR-let-7c (Normal WC $n = 62$ | Large WC $n = 130$); miR-122 (Normal FG $n = 131$ | High FG $n = 61$) and miR-139 (Normal FG $n = 101$ | High FG $n = 41$). Comparisons between groups in miRNA levels were conducted using the adjusted Wald test. The box plots depict the 25th–75th percentile, and the white line represents the median of each group. $p < 0.05$ indicates statistically significant differences.

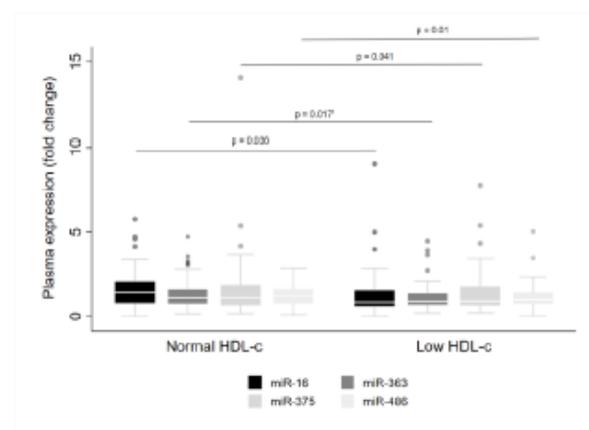


Figure 4. Levels of miRNA in plasma from adults with normal or low HDL-c concentrations. The sample sizes were as follows: miR-16, miR-375 and miR-486 (Normal HDL-c $n = 92$ | Low HDL-c $n = 92$).

100); miR-363 (Normal HDL-c $n = 92$ | Low HDL-c $n = 99$). Comparisons between individuals with normal and low HDL-c for miRNA levels were conducted using the adjusted Wald test. The box plots depict the 25th–75th percentile, and the white line represents the median of each group. $p < 0.05$ indicates statistically significant differences.

Finally, we examined miRNA levels according to the presence of IR. For the whole cohort, we observed that there were higher levels of miR-let-7c ($p = 0.005$), miR-122 ($p = 0.027$), miR-126 ($p = 0.020$) and miR-30a ($p = 0.026$) in individuals with IR than in individuals without IR (Figure 5A). When stratified by sex, miR-let-7c ($p = 0.002$) and miR-126 ($p = 0.020$) showed higher levels in women with IR (Figure 5B).

There were no differences in levels of any of the 21 miRNAs in our panel according to the BMI classification (Table S1).

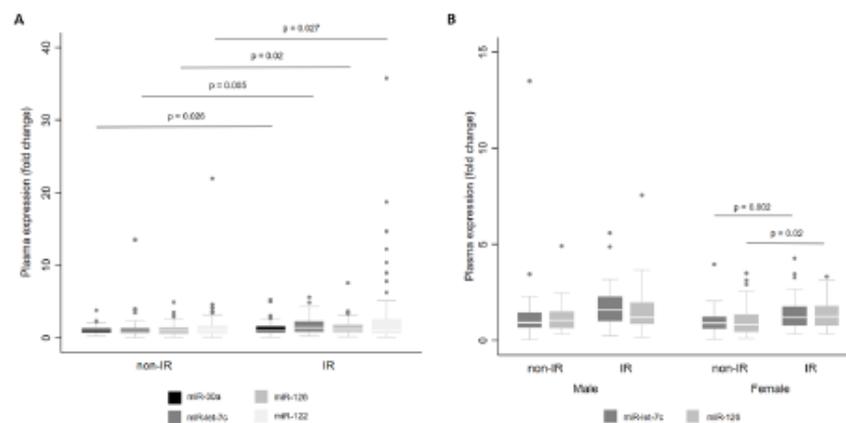


Figure 5. Levels of miR-30a, miR-122, miR-126 and miR-let-7c in plasma from adults with and without insulin resistance (IR) for the whole cohort (A) and by sex (B). Comparisons between groups were conducted using the adjusted Wald test. The box plots depict the 25th–75th percentile, and the white line represents the median of each group. $p < 0.05$ indicates statistically significant differences.

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first population-based study using data from Brazilian individuals to evaluate circulating miRNAs in adults with MetS. Our results propose that levels of miRNAs in plasma differ according to sex, number of MetS components and individual risk factors for MetS. In our study, miR-16 and miR-363 were identified as potential biomarkers of MetS in women and the levels of miR-let-7c and miR-30a in plasma increased with the number of MetS components in men. Notably, levels of eight miRNAs were altered in the presence of four MetS components. Finally, 12 miRNAs showed sex-specific responses according to the presence of cardiometabolic risk factors.

MetS is a multifactorial condition in which the risk of cardiometabolic disease increases according to the number of MetS components [20,21]. In addition, the clustering of risk factors for MetS promotes metabolic alterations able to change circulating microRNA levels [7]. In the present study, we provide data that corroborate these aspects and, therefore, highlight the importance of evaluating the number of MetS components and each risk factor for MetS.

Levels of miR-16 and miR-363 were lower in women with MetS in this study. These miRNAs present, among the potential targets, genes related to cell signaling, metabolism regulation, mitochondrial function, and inflammation (Table 3).

Downregulation of miR-16 might contribute to reduced oxidative stress by positive feedback of *BCL2*—the gene that encodes anti-apoptotic BCL-2 proteins [22]—and

antioxidant genes *CAT*, *SOD1* and *GPX* [23]. Downregulation of miR-16 can also protect against cellular damage and inflammation by regulating the NF- κ B pathway [24]. In addition, an inverse relationship is observed between miR-16 levels and the synthesis of mTOR and p70S6K1 [25], which may reflect on the improvement of glycemic metabolism. At the same time, miR-363 regulates the Notch signaling pathway, being related to hypoxia-induced injury in cardiomyocytes [26], and glucose and lipid metabolism [27].

We observed sex-specific differences in levels of miR-30a and miR-let-7c according to number of MetS components, with higher levels in men with one or more components. Analysis of predicted gene targets indicates a close relationship between miR-30a and insulin sensitivity by targeting *IRS-1/2* [28]. MiR-30a improves mitochondrial respiration in human adipocytes [6] and regulates differentiation and expansion of adipose tissue by activating PPAR γ [29]. Also, miR-30a has been shown to directly suppress the STAT1 signaling pathway and, consequently, an anti-inflammatory role in adipocytes [6].

In contrast, higher levels of miR-let-7c may increase the inflammatory response because it leads to reduction in plasma IL-10 concentration [30]. Furthermore, the higher levels of miR-let-7c may suppress RFX6 levels, an essential transcription factor in the development of islet cells and in maintenance of mature β -cells, and such reduced RFX6 levels could lead to impaired insulin secretion and aberrant glucose metabolism [31]. The Let-7 family is a well-conserved family of 12 miRNAs studied extensively because they are linked to critical cell functions involved in several processes including development, ageing [32] and tumor suppressor [33].

Our results are in line with other reports in which higher levels of miR-let-7e (a member of the Let-7 family) were identified as an early marker of metabolic dysfunction in children with MetS [34]. In addition, we found higher levels of miR-150 in females with 1–2 MetS components. Increased levels of miR-150 were observed in acute myocardial infarction and may be a potential biomarker for early diagnosis [35].

Three (miR-let-7c, miR-122, miR-30a) and four (miR-146a, miR-15a, miR-222, miR-30d) miRNAs were increased in men and women with a large WC, respectively. Abdominal obesity is an essential component of MetS, and a key risk factor for the resulting complications [1,7], as it causes insulin resistance, lipotoxicity, hormone release and chronic production of pro-inflammatory cytokines [3,5]. Consistent with these observations, we found that levels of four of the seven miRNAs mentioned above (miR-122, miR-126, miR-30a and miR-let-7c) were altered in adults with insulin resistance from urban Brazil. In addition, both miR-122 and miR-30a were increased in men with high blood pressure relative to men with normal blood pressure. As shown in Table 3, miR-let-7c, miR-30a and miR-122 are related to the control of energy metabolism, targeting genes linked to insulin signaling (e.g., *IRS1/2*, *PIK3R*, *FOXO1*), adipogenesis (*PPARGC1A*, *FOXO1*), lipid oxidation (e.g., *IGF1*, *PDK4*), which strengthens the evidence for the mechanistic participation of these miRNAs in the events that culminate in obesity, insulin resistance and endothelial dysfunction.

New indications of the therapeutic potential of miR-122 are being discovered. For example, Yaman et al. [36] showed that miR-122 was increased in individuals with high postprandial response to the oral fat tolerance test, which may support elevated or prolonged postprandial lipemia. In addition, the miR-122/miR-30c ratio was associated with microsomal triglyceride transfer protein, Apo B-48, triacylglycerol concentrations and chylomicron particles [36]. Furthermore, miR-122 may help in the early diagnosis and risk estimation of non-alcoholic fatty liver disease in individuals with type 2 diabetes [37]. Considering the gene targets of miR-122, it seems likely that higher levels of miR-122 are a risk factor for endothelial dysfunction [38]. Similarly, miR-30d promotes fatty acid beta-oxidation and endothelial cell dysfunction, and increased levels were observed in coronary microvascular dysfunction [39].

Levels of miR-139 were lower in individuals with fasting blood glucose ≥ 100 mg/dL but did not seem to be influenced by other components of MetS. This observation agrees with previous findings in individuals with diabetes, in which miR-139 upregulation was

associated with endothelial cell dysfunction by targeting c-jun-VEGF/PDGF-B pathway [10]. In animal models, miR-139-5p directly regulates *IRS1* in the pancreas [40].

In addition, we observed reduced levels of miR-16, miR-375, miR-486 and miR-363 in plasma from individuals with low HDL-c concentrations, and reduced plasma levels of miR-16 in men with higher plasma triacylglycerol concentrations. *In silico* bioinformatic analysis did not reveal direct targets of lipid metabolism for either of these miRNAs. However, there is evidence for the role of these miRNAs in the HDL-c biogenesis and hepatic uptake, cholesterol efflux and bile acid synthesis and secretion [41]. Since HDL-c is one of the carriers of circulating miRNAs in cardiometabolic disorders [41], this might explain our findings. Others have reported a positive association of miR-16 with insulin sensitivity and HDL-c concentration, and a negative association with WC and triacylglycerols concentration [42].

We did not observe changes in miR-375 levels when evaluating other components for MetS. MiR-375 is highly expressed in the pancreatic β -cell where it is responsible for regulating insulin secretion. MiR-375 knockout mice have impaired pancreas proliferative capacity and reduced beta cell mass, and, consequently, impaired glucose metabolism [43]. Other authors have reported decreased miR-375 in plasma from women with MetS [44].

Supporting findings from previous studies, we found sex-specific levels of miRNAs in MetS. It is known that sex influences the risk of MetS-related death, gene levels and miRNA regulation [45–47]. Sex hormones such as estrogen regulate the action of the ribonucleases Droscha and Dicer, and the levels of argonaute proteins which affect post-transcriptional processing of miRNA [46].

Although a considerable number of studies in the literature have proposed a role for circulating miRNAs, there is limited evidence linking miRNAs and MetS [7,44]. In addition, findings from the available studies show high heterogeneity since they have investigated circulating miRNAs in different clinical conditions [7]. Thus, the present study sheds light on the miRNA profile in individuals with MetS.

This study has limitations: specifically, we have used web-based tools to predict the specific targets (or place of origin) of miRNAs and have not measured this directly. In addition, the reduced number of individuals in each of the groups could limit the power to detect possible relationships. Finally, the use of a cross-sectional study design means that we cannot infer causality for the observed associations.

5. Conclusions

In summary, in this representative sample of adults from urban Brazil, we have observed significant associations between levels of miRNAs in plasma with abdominal obesity, insulin resistance, high blood pressure, high plasma triacylglycerols and low HDL-c concentrations. In addition, we have reported that individual miRNAs (notably miR-122, miR-let-7c, miR-30a and miR-16) showed specific responses according to stage of MetS risk and sex of individuals. These findings form a basis for future research designed to explain the participation of these miRNAs in the metabolic pathways that are dysregulated in the development of cardiovascular risk.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/metabo13010002/s1>, Figure S1: Sample selection; Table S1: Levels of 21 miRNAs in plasma of the adults from a population-based study grouped by Body Mass Index.

Author Contributions: P.N.B.-L.: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing—Original draft preparation; G.B.d.C.: Formal analysis, Writing—Reviewing and Editing; T.B.P.: Methodology, Formal analysis, Writing—Reviewing and Editing; F.M.S.: Formal analysis, Writing—Reviewing and Editing; R.M.F.: Project administration, Data curation, Writing—Reviewing and Editing; F.C.M.: Writing—Reviewing and Editing; J.C.M.: Writing—Reviewing and Editing;

M.M.R.: Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing—Reviewing and Editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the São Paulo Research Foundation—FAPESP, grant numbers 2017/05125-7|2019/22934-1|2020/03104-5 and National Council for Scientific and Technological Development—CNPq, grant number 150834/2020-9.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Research Ethics Committees of the School of Public Health, University of Sao Paulo (# 43838621.7.0000.5421 and # 30848914.7.0000.5421 for the 2015 ISA-Nutrition).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: All the data elaborated are contained within the article or Supplementary Materials.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- International Diabetes Federation. IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome. 2006. Available online: <https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definition-of-the-metabolic-syndrome.html> (accessed on 8 November 2022).
- Wang, Y.-T.; Tsai, P.-C.; Liao, Y.-C.; Hsu, C.-Y.; Juo, S.-H.H. Circulating MicroRNAs Have a Sex-Specific Association with Metabolic Syndrome. *J. Biomed. Sci.* **2013**, *20*, 72. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-20-72>.
- Quintanilha, B.J.; Reis, B.Z.; Duarte, G.B.S.; Cozzolino, S.M.F.; Rogero, M.M. Nutrимиomics: Role of MicroRNAs and Nutrition in Modulating Inflammation and Chronic Diseases. *Nutrients* **2017**, *9*, 1168. <https://doi.org/10.3390/nu9111168>.
- Breiner, S.P.; Sabater, L.; Malcomson, F.C.; Afshar, S.; Marun, J.; Mathers, J.C. Obesity and Roux-En-Y Gastric Bypass Drive Changes in MiR-31 and MiR-215 Levels in the Human Rectal Mucosa. *Int. J. Obes.* **2022**, *46*, 333–341. <https://doi.org/10.1038/s41366-021-01005-y>.
- Landrier, J.F.; Derghal, A.; Mounien, L. MicroRNAs in Obesity and Related Metabolic Disorders. *Cells* **2019**, *8*, 859. <https://doi.org/10.3390/cells8080859>.
- Koh, E.H.; Chernis, N.; Saha, P.K.; Xiao, L.; Bader, D.A.; Zhu, B.; Rajapakse, K.; Hamilton, M.P.; Liu, X.; Perera, D.; et al. MiR-30a Remodels Subcutaneous Adipose Tissue Inflammation to Improve Insulin Sensitivity in Obesity. *Diabetes* **2018**, *67*, 2541–2553. <https://doi.org/10.2337/db17-1378>.
- Brandão-Lima, P.N.; de Carvalho, G.B.; Payolla, T.B.; Sarti, F.M.; Rogero, M.M. Circulating microRNA Related to Cardiometabolic Risk Factors for Metabolic Syndrome: A Systematic Review. *Metabolites* **2022**, *12*, 1044. <https://doi.org/10.3390/metabo12111044>.
- Qin, B.; Xiao, B.; Liang, D.; Li, Y.; Jiang, T.; Yang, H. MicroRNA Let-7c Inhibits Bcl-XI Levels and Regulates Ox-LDL-Induced Endothelial Apoptosis. *BMB Rep.* **2012**, *45*, 464–469. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2012.45.8.033>.
- Giardina, S.; Hernandez-Alonso, P.; Díaz-Lopez, 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. *Clin. Nutr.* **2019**, *38*, 438–443. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.11.014>.
- Luo, Y.F.; Wan, X.X.; Zhao, L.L.; Guo, Z.; Shen, R.T.; Zeng, P.Y.; Wang, L.H.; Yuan, J.J.; Yang, W.J.; Yue, C.; et al. MicroRNA-139-5p Upregulation Is Associated with Diabetic Endothelial Cell Dysfunction by Targeting c-Jun. *Aging* **2021**, *13*, 1186–1211. <https://doi.org/10.18632/aging.202257>.
- O’Neil, A.; Scovelle, A.J.; Milner, A.J.; Kavanagh, A. Gender/Sex as a Social Determinant of Cardiovascular Risk. *Circulation* **2018**, *137*, 854–864. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028595>.
- Fisberg, R.M.; Sales, C.H.; De Mello Fontanelli, 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* **2018**, *10*, 169. <https://doi.org/10.3390/nu10020169>.
- Alves, M.C.G.P.; Escuder, M.M.L.; Goldbaum, M.; Barros, M.B.d.A.; Fisberg, R.M.; Cesar, C.L.G. Sampling Plan in Health Surveys, City of São Paulo, Brazil, 2015. *Rev. Saúde Pública* **2018**, *52*, 1–11. <https://doi.org/10.11606/S1518-8787.2018052000471>.
- Matthews, D.R.; Hosker, J.P.; Rudenski, A.S.; Naylor, B.A.; Treacher, D.F.; Turner, R.C. Homeostasis Model Assessment: Insulin Resistance and β -Cell Function from Fasting Plasma Glucose and Insulin Concentrations in Man. *Diabetologia* **1985**, *28*, 412–419. <https://doi.org/10.1007/BF00280883>.
- Geloneze, B.; Vasques, A.C.J.; Stabe, C.F.C.; Pareja, J.C.; Rosado, L.E.F.P.d.L.; Queiroz, E.C.d.; Tambascia, M.A. HOMA1-IR and HOMA2-IR Indexes in Identifying Insulin Resistance and Metabolic Syndrome: Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **2009**, *53*, 281–287. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302009000200020>.

16. Agarwal, V.; Bell, G.W.; Nam, J.W.; Bartel, D.P. Predicting Effective MicroRNA Target Sites in Mammalian MRNAs. *Elife* **2015**, *4*, e05005. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>.
17. McGeary, S.E.; Lin, K.S.; Shi, C.Y.; Pham, T.M.; Bisaria, N.; Kelley, G.M.; Bartel, D.P. The Biochemical Basis of MicroRNA Targeting Efficacy. *Science* **2019**, *366*, eaav1741. <https://doi.org/10.1126/science.aav1741>.
18. Chen, Y.; Wang, X. MiRDB: An Online Database for Prediction of Functional MicroRNA Targets. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D127–D131. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz757>.
19. Streiner, D.L.; Norman, G.R. Correction for multiple testing: Is there a resolution? *Chest* **2011**, *140*, 16–18. <https://doi.org/10.1378/chest.11-0523>.
20. Lee, E.Y.; Han, K.; Kim, D.H.; Park, Y.M.; Kwon, H.S.; Yoon, K.H.; Kim, M.K.; Lee, S.H. Exposure-Weighted Scoring for Metabolic Syndrome and the Risk of Myocardial Infarction and Stroke: A Nationwide Population-Based Study. *Cardiovasc. Diabetol.* **2020**, *19*, 153. <https://doi.org/10.1186/s12933-020-01129-x>.
21. Gueembe, M.J.; Fernandez-Lazaro, C.I.; Sayon-Orea, C.; Toledo, E.; Moreno-Iribas, C.; Cosials, J.B.; Reyero, J.B.; Martínez, J.D.; Diego, P.G.; Uche, A.M.G.; et al. Risk for Cardiovascular Disease Associated with Metabolic Syndrome and Its Components: A 13-Year Prospective Study in the RIVANA Cohort. *Cardiovasc. Diabetol.* **2020**, *19*, 195. <https://doi.org/10.1186/s12933-020-01166-6>.
22. Calderon-Dominguez, M.; Mangas, A.; Belmonte, T.; Quezada-Fejoo, M.; Ramos, M.; Toro, R. Ischemic Dilated Cardiomyopathy Pathophysiology through MicroRNA-16-5p. *Rev. Española Cardiol.* **2021**, *74*, 740–749. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2020.08.012>.
23. Toro, R.; Pérez-Serra, A.; Mangas, A.; Campuzano, O.; Sarquella-Brugada, G.; Quezada-Fejoo, M.; Ramos, M.; Alcalá, M.; Carrera, E.; Garcia-Padilla, C.; et al. MiR-16-5p Suppression Protects Human Cardiomyocytes against Endoplasmic Reticulum and Oxidative Stress-Induced Injury. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1036. <https://doi.org/10.3390/ijms23031036>.
24. Zhang, H.J.; Zhang, Y.N.; Teng, Z.Y. Downregulation of MiR-16 Protects H9c2(2-1) Cells against Hypoxia/Reoxygenation Damage by Targeting CIAPIN1 and Regulating the NF-KB Pathway. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *20*, 3113–3122. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10568>.
25. Lee, D.E.; Brown, J.L.; Rosa, M.E.; Brown, L.A.; Perry, R.A.; Wiggs, M.P.; Nilsson, M.I.; Crouse, S.F.; Fluckey, J.D.; Washington, T.A.; et al. MicroRNA-16 Is Downregulated During Insulin Resistance and Controls Skeletal Muscle Protein Accretion. *J. Cell. Biochem.* **2016**, *117*, 1775–1787. <https://doi.org/10.1002/jcb.25476>.
26. Meng, X.; Ji, Y.; Wan, Z.; Zhao, B.; Feng, C.; Zhao, J.; Li, H.; Song, Y. Inhibition of MiR-363 Protects Cardiomyocytes against Hypoxia-Induced Apoptosis through Regulation of Notch Signaling. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *90*, 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.03.080>.
27. Peng, Y.H.; Wang, P.; He, X.Q.; Hong, M.Z.; Liu, F. Micro Ribonucleic Acid-363 Regulates the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Threonine Protein Kinase Axis by Targeting NOTCH1 and Forkhead Box C2, Leading to Hepatic Glucose and Lipids Metabolism Disorder in Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Diabetes Investig.* **2022**, *13*, 236–248. <https://doi.org/10.1111/jdi.13695>.
28. Copps, K.D.; White, M.F. White Regulation of Insulin Sensitivity by Serine/Threonine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate Proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia* **2012**, *55*, 2565–2582. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2644-8>.
29. Saha, P.K.; Hamilton, M.P.; Rajapakshe, K.; Putluri, V.; Felix, J.B.; Masschelin, P.; Cox, A.R.; Bajaj, M.; Putluri, N.; Coarfa, C.; et al. MiR-30a Targets Gene Networks That Promote Browning of Human and Mouse Adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2020**, *319*, E667–E677. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00045.2020>.
30. Swaminathan, S.; Suzuki, K.; Seddiki, N.; Kaplan, W.; Cowley, M.J.; Hood, C.L.; Clancy, J.L.; Murray, D.D.; Méndez, C.; Gelgor, L.; et al. Differential Regulation of the Let-7 Family of MicroRNAs in CD4 + T Cells Alters IL-10 Levels. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 6238–6246. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101196>.
31. Piccand, J.; Strasser, P.; Hodson, D.J.; Meunier, A.; Ye, T.; Keime, C.; Birling, M.C.; Rutter, G.A.; Gradwohl, G. Rfx6 Maintains the Functional Identity of Adult Pancreatic β Cells. *Cell Rep.* **2014**, *9*, 2219–2232. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.033>.
32. Iacomino, G.; Siani, A. Role of MicroRNAs in Obesity and Obesity-Related Diseases. *Genes Nutr.* **2017**, *12*, 23. <https://doi.org/10.1186/s12263-017-0577-z>.
33. Balzeau, J.; Menezes, M.R.; Cao, S.; Hagan, J.P. The LIN28/Let-7 Pathway in Cancer. *Front. Genet.* **2017**, *8*, 31. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00031>.
34. Krause, B.J.; Carrasco-Wong, I.; Dominguez, A.; Arnaiz, P.; Farias, M.; Barja, S.; Mardones, F.; Casanello, P. Micro-RNAs Let7e and 126 in Plasma as Markers of Metabolic Dysfunction in 10 to 12 Years Old Children. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0128140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128140>.
35. Li, H.; Zhang, P.; Li, F.; Yuan, G.; Wang, X.; Zhang, A.; Li, F. Plasma MiR-22-5p, MiR-132-5p, and MiR-150-3p Are Associated with Acute Myocardial Infarction. *Biomed Res. Int.* **2019**, *2019*, 5012648. <https://doi.org/10.1155/2019/5012648>.
36. Yaman, S.O.; Orem, A.; Yucesan, F.B.; Kural, B.V.; Orem, C. Evaluation of Circulating MiR-122, MiR-30c and MiR-33a Levels and Their Association with Lipids, Lipoproteins in Postprandial Lipemia. *Life Sci.* **2021**, *264*, 118585. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118585>.
37. Ye, D.; Zhang, T.; Lou, G.; Xu, W.; Dong, F.; Chen, G.; Liu, Y. Plasma MiR-17, MiR-20a, MiR-20b and MiR-122 as Potential Biomarkers for Diagnosis of NAFLD in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Life Sci.* **2018**, *208*, 201–207.
38. 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. *Hypertens. Res.* **2020**, *43*, 511–517. <https://doi.org/10.1038/s41440-020-0405-5>.

39. Veitch, S.; Njock, M.-S.; Chandy, M.; Siraj, M.A.; Chi, L.; Mak, H.; Yu, K.; Rathnakumar, K.; Perez-Romero, C.A.; Chen, Z.; et al. MiR-30 Promotes Fatty Acid Beta-Oxidation and Endothelial Cell Dysfunction and Is a Circulating Biomarker of Coronary Microvascular Dysfunction in Pre-Clinical Models of Diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.* **2022**, *21*, 31. <https://doi.org/10.1186/s12933-022-01458-z>.
40. Li, J.; Su, L.; Gong, Y.Y.; Ding, M.L.; Hong, S.; Bin, Yu, S.; Xiao, H. Downregulation of MiR-139-5p Contributes to the Antiapoptotic Effect of Liraglutide on the Diabetic Rat Pancreas and INS-1 Cells by Targeting IRS1. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0173576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173576>.
41. Canfrán-duque, A.; Lin, C.; Goedeke, L.; Suárez, Y.; Fernández-hernando, C. MicroRNAs and HDL Metabolism. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2016**, *36*, 1076–1084. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307028.microRNAs>.
42. Ma, E.; Fu, Y.; Garvey, W.T. Relationship of Circulating MiRNAs with Insulin Sensitivity and Associated Metabolic Risk Factors in Humans. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **2018**, *16*, 82–89. <https://doi.org/10.1089/met.2017.0101>.
43. Wei, R.; Yang, J.; Liu, G.Q.; Gao, M.J.; Hou, W.F.; Zhang, L.; Gao, H.W.; Liu, Y.; Chen, G.A.; Hong, T.P. Dynamic Levels of MicroRNAs during the Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Insulin-Producing Cells. *Gene* **2013**, *518*, 246–255.
44. Reis, B.Z.; Duarte, G.B.S.; Vargas-Mendez, E.; Ferreira, L.R.P.; Barbosa, F.; Cercato, C.; Rogero, M.M.; Cozzolino, S.M.F. Brazil Nut Intake Increases Circulating MiR-454-3p and MiR-584-5p in Obese Women. *Nutr. Res.* **2019**, *67*, 40–52. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2019.05.004>.
45. Guo, L.; Zhang, Q.; Ma, X.; Wang, J.; Liang, T. MiRNA and mRNA Levels Analysis Reveals Potential Sex-Biased MiRNA Levels. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 39812. <https://doi.org/10.1038/srep39812>.
46. Sharma, S.; Eghbali, M. Influence of Sex Differences on MicroRNA Gene Regulation in Disease. *Biol. Sex Differ.* **2014**, *5*, 3. <https://doi.org/10.1186/2042-6410-5-3>.
47. Shen, J.J.; Wang, Y.F.; Yang, W. Sex-Interacting MRNA-and MiRNA-EQTLs and Their Implications in Gene Levels Regulation and Disease. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 313. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00313>.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados evidenciaram a associação entre a expressão plasmática de microRNA e alterações em biomarcadores relacionados ao metabolismo da glicose e de lipídios, à adiposidade e à resposta inflamatória. Além disso, a investigação da relação entre a dieta e a expressão de microRNA circulantes lançou luz para a atuação chave de grupos alimentares na modulação de vias relacionadas ao risco cardiovascular. No entanto, observa-se a necessidade de estudos adicionais a fim de esclarecer as discrepâncias encontradas.

Desse modo, o presente estudo reafirma o potencial dos microRNA circulantes como biomarcadores de progressão, diagnóstico e resposta ao tratamento em diversas condições clínicas. Somado a rápida resposta às intervenções, a utilização de microRNA como biomarcadores apresenta como vantagens a elevada sensibilidade e especificidade, facilidade de detecção por técnicas minimamente invasivas, abundância em diversos biofluidos corporais (soro/plasma, urina, saliva), estabilidade pós-coleta.

Além disso, destaca-se o pioneirismo do trabalho desenvolvido, uma vez que estudos de base populacional que relacionam o perfil plasmático de expressão de microRNA com biomarcadores de risco cardiovascular e dieta em adultos são inexistentes na população brasileira. Os resultados apresentados podem servir de base para o desenvolvimento de estudos de base populacional em outras regiões do país, contribuindo para o mapeamento do estado de saúde da população brasileira, bem como, para a elaboração de intervenções nutricionais mais eficazes e direcionadas.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Embora o primeiro estudo investigando microRNA seja datado de 1993, este é um campo em evolução. O interesse crescente na associação entre microRNA e desenvolvimento de doenças teve seu apogeu em 2021, sendo observado na base de dados científicos da *PubMed* mais de 9000 artigos publicados sobre a temática.

No entanto, as relações entre microRNA, dieta e risco cardiometabólico estão em fase inicial de investigação, com poucos estudos disponíveis até o momento. Estudos iniciais revelaram a associação entre padrão de expressão de microRNA e componentes alimentares, por mecanismos ainda não elucidados. Sabe-se que a expressão de microRNA é influenciada por fatores como sexo, idade, atividade física e condição clínica. Desse modo, os trabalhos futuros devem aprofundar os mecanismos pelos quais os microRNA regulam os genes associados ao risco cardiometabólico incluindo os fatores associados.

No que se refere ao padrão alimentar, poucos estudos se concentram na identificação dos padrões de expressão de microRNA de acordo com o tipo de dieta adotada e consumo de componentes isolados. Com isso, observa-se grande leque de opções para trabalhos futuros que auxiliem na identificação de biomarcadores específicos relacionados ao risco cardiometabólico e sua associação com o padrão alimentar. A ampliação do número de estudos com indivíduos de diferentes etnias, idades, perfis genéticos e hábitos alimentares e culturais irão agregar informações importantes para o manejo dietoterápico mais preciso e eficaz para a redução do risco e tratamento de DCNT.

REFERÊNCIAS

- AHN, J.; LEE, H.; JUNG, C. H.; JEON, T. II; HA, T. Y. MicroRNA - 146b promotes adipogenesis by suppressing the SIRT1 - FOXO1 cascade. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, p. 1602–1612, 2013.
- AL-KAFAJI, G.; AL-MAHROOS, G.; ALSAYED, N. A.; HASAN, Z. A.; NAWAZ, S.; BAKHIET, M. Peripheral blood microRNA-15a is a potential biomarker for type 2 diabetes mellitus and pre-diabetes. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 5, p. 7485–7490, 2015.
- ALDER, H.; TACCIOLI, C.; JIANG, Y.; SMALLEY, K. J.; FADDA, P.; OZER, H. G.; HUEBNER, K.; FARBER, J. L.; CROCE, M.; FONG, L. Y. Y. 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.; WÅGSÄ TER, 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, 2017.
- ASSMANN, T. S.; RIEZU-BOJ, J. I.; MILAGRO, F. I.; MARTÍNEZ, J. A. Circulating adiposity-related microRNAs as predictors of the response to a low-fat diet in subjects with obesity. **J Cell Mol Med**, v. 24, n. 5, p. 2956–2967, 2020.
- BAIER, S. R.; NGUYEN, C.; XIE, F.; WOOD, J. R.; ZEMPLI, 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, p. 1495–1500, 2014.
- BAYRAKTAR, R.; VAN ROOSBROECK, K.; CALIN, G. A. Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones. **Molecular Oncology**, v. 11, n. 12, p. 1673–1686, 2017.
- BECKETT, E. L.; YATES, Z.; VEYSEY, M.; DUESING, K.; LUCOCK, M. The role of vitamins and minerals in modulating the expression of microRNA. **Nutrition Research Reviews**, v. 27, n. 1, p. 94–106, 2014.
- BIANCHI, M.; RENZINI, A.; ADAMO, S.; MORESI, V. Coordinated actions of microRNAs with other epigenetic factors regulate skeletal muscle development and adaptation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 1–14, 2017.
- BRANDÃO-LIMA, P. N.; DE CARVALHO, G. B.; PAYOLLA, T. B.; SARTI, F. M. F. M.; FISBERG, R. M.; MALCOMSON, F. C.; MATHERS, J. C.; ROGERO, M. M. Circulating microRNAs Showed Specific Responses according to Metabolic Syndrome Components and Sex of Adults from a Population-Based Study. **Metabolites**, v. 13, n. 11, p. 1–24, 2022a.
- BRANDÃO-LIMA, P. N.; DE CARVALHO, G. B.; PAYOLLA, T. B.; SARTI, F. M.; ROGERO, M. M. Circulating microRNA Related to Cardiometabolic Risk Factors for Metabolic Syndrome: A Systematic Review. **Metabolites**, v. 12, n. 11, p. 1–24, 2022b.
- CATALANOTTO, C.; COGONI, C.; ZARDO, G. MicroRNA in Control of Gene Expression : An Overview of Nuclear Functions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1712, 2016.

- CESAR, C. L. G.; CARANDINI, L.; ALVES, M. C. G. P.; BARROS, M. B. de A.; GOLDBAUM, M. **Saúde e condição de vida em São Paulo: inquérito multicêntrico de saúde no Estado de São Paulo**. São Paulo: SIBI USP, 2005.
- CHEN, L.; DAI, Y. M.; JI, C. B.; YANG, L.; SHI, C. M.; XU, G. F.; PANG, L. X.; HUANG, F. Y.; ZHANG, C. M.; GUO, X. R. MiR-146b is a regulator of human visceral preadipocyte proliferation and differentiation and its expression is altered in human obesity. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 393, n. 1–2, p. 65–74, 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.
- CORRÊA, T. A. F.; QUINTANILHA, B. J.; NORDE, M. M.; PINHEL, M. A. de S.; NONINO, C. B.; ROGERO, M. M. Nutritional genomics, inflammation and obesity. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 64, n. 3, p. 205–222, 2020.
- CRUZ, K. J. C.; DE OLIVEIRA, A. R. S.; MORAIS, J. B. S.; SEVERO, J. S.; MARREIRO, PHD, D. do N. Role of microRNAs on adipogenesis, chronic low-grade inflammation, and insulin resistance in obesity. **Nutrition**, v. 35, p. 28–35, 2017.
- DE CANDIA, P.; SPINETTI, G.; SPECCHIA, C.; SANGALLI, E.; LA SALA, L.; UCCELLATORE, A.; LUPINI, S.; GENOVESE, S.; MATARESE, G.; CERIELLO, A.; SALA, L. La; UCCELLATORE, A.; LUPINI, S.; GENOVESE, S.; MATARESE, G.; CERIELLO, A. A Unique Plasma MicroRNA Profile Defines Type 2 Diabetes Progression. **PloS one**, v. 12, n. 12, p. e0188980–e0188980, 4 dez. 2017.
- DESGAGNÉ, V.; GUAY, S. P.; GUÉRIN, R.; CORBIN, F.; COUTURE, P.; LAMARCHE, B.; BOUCHARD, L. Variations in HDL-carried miR-223 and miR-135a concentrations after consumption of dietary trans fat are associated with changes in blood lipid and inflammatory markers in healthy men - an exploratory study. **Epigenetics**, v. 11, n. 6, p. 438–448, 2016.
- 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, 2019.
- FABBRI, M. MicroRNAs and miRceptors: a new mechanism of action for intercellular communication. **Philosophical Transactions Real Society B**, v. 373, 2017.
- FEINBAUM, R.; AMBROS, V.; LEE, R. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 116, n. 116, p. 843–854, 1993.
- 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, n. January, p. 1–11, 2021.
- FISBERG, R. M.; LEME, A. C. B.; PREVIDELLI, Á.; DE MELLO, A. V.; MARTINEZ, A. G.; HERMES SALES, C.; GÓMEZ, G.; KOVALSKYS, I.; HERRERA-CUENCA, M.; CORTÉS SANABRIA, L. Y.; YÉPEZ GARCÍA, M. C.; TORRES, R. G.; RIGOTTI, A.; FISBERG, M. Contribution of Food Groups to Energy, Grams 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. 2424–2436, 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. 197 p.

FISBERG, R. M.; SALES, C. H.; DE MELLO FONTANELLI, 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. 1–13, 2018.

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

FLOWERS, E.; WON, G. Y.; FUKUOKA, Y. Micromas associated with exercise and diet: A systematic review. **Physiological Genomics**, v. 47, n. 1, 1 jan. 2015.

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.

GIARDINA, S.; HERNANDEZ-ALONSO, P.; DIAZ-LOPEZ, A.; SALAS-HUETOS, A.; SALAS-SALVADÓ, J.; BULLÓ, M.; GIARDINA, S.; HERNÁNDEZ-ALONSO, P.; DÍAZ-LÓPEZ, A.; SALAS-HUETOS, A.; SALAS-SALVADÓ, J.; BULLÓ, M.; HERNANDEZ-ALONSO, P.; DÍAZ-LOPEZ, A.; SALAS-HUETOS, A.; SALAS-SALVADÓ, J.; BULLÓ, M. Changes in circulating miRNAs in healthy overweight and obese subjects : Effect of diet composition and weight loss. **Clinical Nutrition**, v. 38, n. 1, p. 438–443, 2019.

GU, N.; YOU, L.; SHI, C.; YANG, L. E. I.; PANG, L.; CUI, X.; JI, C.; ZHENG, W.; GUO, X. Expression of miR-199a-3p in human adipocytes is regulated by free fatty acids and adipokines. **Molecular medicine reports**, v. 14, p. 1180–1186, 2016.

GUENTHER, P.; DEMAIO, T.; INGWERSEN, L.; AL., E. The multiple-pass approach for the 24 hour recall in the Continuing Survey of food intakes by individuals (CSFII) 1994-1996 International Conference on Dietary Assessment Methods. **The FASEB journal**, 10, 198.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 509–524, 2014.

HAJIBABAIE, F.; ABEDPOOR, N.; ASSAREH, N.; TABATABAIEFAR, M. A. The Importance of SNPs at miRNA Binding Sites as Biomarkers of Gastric and Colorectal Cancers : A Systematic Review. **J Pers Med**, v.14, 2022.

HEIANZA, Y.; XUE, Q.; ROOD, J.; BRAY, G. A.; SACKS, F. M.; QI, L. Circulating thrifty microRNA is related to insulin sensitivity , adiposity , and energy metabolism in adults with overweight and obesity : the POUNDS Lost trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 117, n. October 2022, p. 121–129, 2023.

HU, S.; DONG, T. S.; DALAL, S. R.; WU, F.; BISSONNETTE, M. The Microbe-Derived Short Chain Fatty Acid Butyrate Targets miRNA-Dependent p21 Gene Expression in Human Colon Cancer. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. 16221, 2011.

HUANG, V.; PLACE, R. F.; PORTNOY, V.; WANG, J.; QI, Z.; JIA, Z.; YU, A.; SHUMAN, M.; YU, J.; LI, L. Upregulation of Cyclin B1 by miRNA and its implications in cancer.

Nucleic Acids Research, v. 40, n. 4, p. 1695–1707, 2012.

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, 2016a.

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, 2016b.

ISHIDA, M.; SHIMABUKURO, M.; YAGI, S.; NISHIMOTO, S.; KOZUKA, C.; FUKUDA, D.; SOEKI, T.; MASUZAKI, H.; TSUTSUI, M.; SATA, M. MicroRNA-378 Regulates Adiponectin Expression in Adipose Tissue : A New Plausible Mechanism. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 3–10, 2014.

JIMÉNEZ-LUCENA, R.; CAMARGO, A.; ALCALÁ-DÍAZ, J. F.; ROMERO-BALDONADO, C.; LUQUE, R. M.; VAN OMMEN, B.; DELGADO-LISTA, J.; ORDOVÁS, J. M.; PÉREZ-MARTÍNEZ, P.; RANGEL-ZUÑIGA, O. A.; LÓPEZ-MIRANDA, J. A plasma circulating miRNAs profile predicts type 2 diabetes mellitus and prediabetes: from the CORDIOPREV study. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 50, n. 12, 2018.

KARBIENER, M.; NEUHOLD, C.; OPRIESSNIG, P.; PROKESCH, A.; BOGNER-STRAUSS, J. G.; SCHEIDELER, M.; KARBIENER, M.; NEUHOLD, C.; OPRIESSNIG, P.; PROKESCH, A.; BOGNER-STRAUSS, J. G.; SCHEIDELER, M.; KARBIENER, M.; NEUHOLD, C.; OPRIESSNIG, P.; PROKESCH, A.; BOGNER-STRAUSS, J. G.; SCHEIDELER, M. MicroRNA-30c promotes human adipocyte differentiation and co-represses PAI-1 and ALK2. **RNA Biology**, v. 8, n. 5, p. 850–860, 2011.

KAROLINA, D. .; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Circulating Micrnas: Potential Biomarkers in Artherosclerosis. **Atherosclerosis Supplements**, v. 12, n. 1, p. 104, 2011.

KILIC, T.; ERDEM, A.; OZSOZ, M.; CARRARA, S. microRNA biosensors: Opportunities and challenges among conventional and commercially available techniques. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 99, n. May 2017, p. 525–546, 2018.

KIRSCHNER, M. B.; EDELMAN, J. J. B.; KAO, S. C. H.; VALLELY, M. P.; VAN ZANDWIJK, N.; REID, G. The impact of hemolysis on cell-free microRNA biomarkers. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n. MAY, p. 1–13, 2013.

KONG, L.; ZHU, J.; HAN, W.; JIANG, X.; XU, M.; ZHAO, Y.; DONG, Q.; PANG, Z.; GUAN, Q.; GAO, L.; ZHAO, J.; ZHAO, L. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: A clinical study. **Acta Diabetologica**, v. 48, n. 1, p. 61–69, 2011.

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, 2019.

LI, J.; ZHOU, C.; LI, J.; SU, Z.; HAIYAN, S.; JIA, E.; SI, D. Global correlation analysis for microRNA and gene expression profiles in human obesity. **Pathology - Research and Practice**, v. 211, n. 5, p. 361–368, 2015.

LING, H.-Y.; WEN, G.-B.; FENG, S.-D.; TUO, Q.-H.; OU, H.-S.; YAO, C.-H.; ZHU, B.-Y.; GAO, Z.-P.; ZHANG, L.; LIAO, D.-F. MiRNA-375 promotes 3T3-L1 adipocyte

differentiation via modulation of ERK signaling. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 38, n. 4, p. 239–246, 2011.

MA, E.; FU, Y.; GARVEY, W. T. Relationship of Circulating miRNAs with Insulin Sensitivity and Associated Metabolic Risk Factors in Humans. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 16, n. 2, p. 82–89, 2018.

MANSUR, A. J.; BARROSO, L. P. Índice de Desenvolvimento Humano e Doenças Crônicas no Brasil entre 1980 e 2019. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 120, n. 4, p. e20230213, 2023.

MANTILLA-ESCALANTE, D. C.; DE LAS HAZAS, M. C. L.; GIL-ZAMORANO, J.; DEL POZO-ACEBO, L.; CRESPO, M. C.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; DEL SAZ, A.; TOMÉ-CARNEIRO, J.; CARDONA, F.; CORNEJO-PAREJA, I.; GARCÍA-RUIZ, A.; BRIAND, O.; LASUNCIÓN, M. A.; VISIOLI, F.; DÁVALOS, A. Postprandial circulating miRNAs in response to a dietary fat challenge. **Nutrients**, v. 11, n. 6, p. 1–17, 2019.

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. 76 p.

MURRAY, C. J. L.; AFSHIN, A.; ALAM, T.; et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 396, n. 10258, p. 1204–1222, 2020.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Usual Dietary Intakes: The NCI Method**. Disponível em: <<https://epi.grants.cancer.gov/diet/usualintakes/method.html#:~:text=The premise of the NCI,from those used for dietary>>. Acesso em: 6 nov. 2023.

O'BRIEN, J.; HAYDER, H.; ZAYED, Y.; PENG, C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. AUG, p. 1–12, 2018.

ORTEGA, F. J.; MERCADER, J. M.; ROVIRA, O.; GUERRA, E.; ESTEVE, E.; XIFRA, G.; MART, C.; RICART, W.; RIEUSSET, J.; ROME, S.; KARCZEWSKA-KUPCZEWSKA, M.; STRACZKOWSKI, M. Profiling of Circulating MicroRNAs Reveals Common MicroRNAs Linked to Type 2 Diabetes That Change With Insulin Sensitization. **Diabetes Care**, v. 37, n. May, p. 1375–1383, 2014.

OSELLA, M.; RIBA, A.; TESTORI, A.; CORÀ, D.; CASELLE, M.; MACCANI, M. A.; STATE, P. Interplay of microRNA and epigenetic regulation in the human regulatory network. **Frontiers in genetics**, v. 5, n. October, p. 1–10, 2014.

PALMER, J. D.; SOULE, B. P.; SIMONE, B. A.; ZAORSKY, N. G.; JIN, L.; SIMONE, N. L. Dietary alterations caused by microRNA: Can food be medicinal? **Ageing Research Reviews**, p. 1–9, 2014.

PESCADOR, N.; PÉREZ-BARBA, M.; IBARRA, J. M.; CORBATÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAD, M. T.; SERRANO-RIOS, M. Serum Circulating microRNA Profiling for Identification of Potential Type 2 Diabetes and Obesity Biomarkers. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 21–23, 2013.

PILETIC, K.; KUNEJ, T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. **Arch Toxicol**, v. 90, p. 2405–2419, 2016.

PLACE, R. F.; LI, L.; POOKOT, D.; NOONAN, E. J.; DAHIYA, R. MicroRNA-373 induces

expression of genes with complementary promoter sequences. **PNAS**, v. 105, n. 5, p. 1608–1613, 2008.

PRATS-PUIG, A.; ORTEGA, F. J.; MERCADER, J. M.; MORENO-NAVARRETE, J. M.; MORENO, M.; BONET, N.; RICART, W.; LÓPEZ-BERMEJO, A.; FERNÁNDEZ-REAL, J. M. Changes in circulating MicroRNAs are associated with childhood obesity. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 10, p. E1655–E1660, 2013.

QIN, B.; XIAO, B.; LIANG, D.; LI, Y.; JIANG, T.; YANG, H. MicroRNA let-7c inhibits Bcl-xl expression and regulates ox-LDL-induced endothelial apoptosis. **BMB Reports**, v. 45, n. 8, p. 464–469, 2012.

QUINTANILHA, B. J.; PINTO FERREIRA, L. R.; FERREIRA, F. M.; NETO, E. C.; SAMPAIO, G. R.; ROGERO, M. M. Circulating plasma microRNAs dysregulation and metabolic endotoxemia induced by a high-fat high-saturated diet. **Clinical Nutrition**, v. 39, n. 2, p. 554–562, 2020.

QUINTANILHA, B. J.; REIS, B. Z.; DUARTE, G. B. S.; COZZOLINO, S. M. F. F.; ROGERO, M. M.; SILVA DUARTE, G. B.; COZZOLINO, S. M. F. F.; ROGERO, M. M. Nutrимиromics: Role of micromnas and nutrition in modulating inflammation and chronic diseases. **Nutrients**, v. 9, n. 11, p. 1–24, 2017.

RAMZAN, F.; VICKERS, M. H.; MITHEN, R. F. Epigenetics , microRNA and Metabolic Syndrome : A Comprehensive Review. **Int J Mol Sci.**, v. 22, n. 9, 2021.

RANGANATHAN, K.; SIVASANKAR, V. MicroRNAs - Biology and clinical applications. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 18, n. 2, p. 229–234, 2014.

REIS, B. Z.; DUARTE, G. B. S.; VARGAS-MENDEZ, E.; FERREIRA, L. R. P.; BARBOSA, F.; 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.; ADLER, M. E.; CLEMENS, J. C.; MOSHFEGH, A. J. What we eat in America food categories and changes between survey cycles. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 64, p. 107–111, 2017.

SHEANE, B.; SMYTH, P.; SCOTT, K.; AZIZ, R.; BUCKLEY, M.; LODGE, E.; KIELY, N.; KINGSTON, M.; MCGOVERN, E.; HEALY, M.; WALSH, J.; SHEILS, O.; CUNNANE, G. An Association between MicroRNA-21 Expression and Vitamin D Deficiency in Coronary Artery Disease. **MicroRNA**, v. 4, n. 1, p. 57–63, 2015.

SHI, C.; ZHU, L.; CHEN, X.; GU, N.; CHEN, L.; ZHU, L.; YANG, L. IL-6 and TNF- a Induced Obesity-Related Inflammatory Response Through Transcriptional Regulation of miR-146b. **Journal of interferon & cytokine research**, v. 34, n. 5, p. 342–348, 2014.

SHIVAPPA, N.; STECK, S. E.; HURLEY, T. G.; HUSSEY, J. R.; HE, J. R. Designing and developing a literature-derived , population-based dietary inflammatory index. **Public Health Nutrition**, v. 17, n. 8, p. 1689–1696, 2014.

SHIVAPPA, N.; WIRTH, M. D.; HUSSEY, J. R.; HURLEY, T. G. Perspective : The Dietary Inflammatory Index (DII)— Lessons Learned , Improvements Made , and. **American Society for Nutrition**, v. 10, p. 185–195, 2019.

SLATTERY, M. L.; HERRICK, J. S.; MULLANY, L. E.; STEVENS, J. R.; WOLFF, R. K. Pharmacogenomics and Personalized Medicine Dovepress Diet and lifestyle factors

associated with miRNA expression in colorectal tissue. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**, p. 10–11, 2017.

TAKIZAWA, S.; MATSUZAKI, J.; OCHIYA, T. Circulating microRNAs: Challenges with their use as liquid biopsy biomarkers. **Cancer Biomarkers**, v. 35, n. 1, p. 1–9, 2022.

TARALLO, S.; PARDINI, B.; MANCUSO, G.; ROSA, F.; GAETANO, C. Di; ROSINA, F.; VINEIS, P.; NACCARATI, A. MicroRNA expression in relation to different dietary habits: a comparison in stool and plasma samples. **Mutagenesis**, v. 29, n. 5, p. 385–391, 2014.

VASUDEVAN, S.; STEITZ, J. A. AU-Rich-Element-Mediated Upregulation of Translation by FXR1 and Argonaute 2. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1105–1118, 2007.

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, 2014.

WANG, Y. C.; LI, Y.; WANG, X. Y.; ZHANG, D.; ZHANG, H.; WU, Q.; HE, Y. Q.; WANG, J. Y.; ZHANG, L.; XIA, H.; YAN, J.; LI, X.; YING, H. Circulating miR-130b mediates metabolic crosstalk between fat and muscle in overweight/obesity. **Diabetologia**, v. 56, n. 10, p. 2275–2285, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. **WHO Technical Report Series**, p. 253, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Noncommunicable diseases: country profiles 2018**. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/noncommunicable-diseases/surveillance/data/profiles-ncd>>

YAO, Q.; CHEN, Y.; ZHOU, X. The roles of microRNAs in epigenetic regulation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 51, p. 11–17, 2019.

YING, S.-Y.; CHANG, D. C.; LIN, S.-L. The MicroRNA (miRNA): Overview of the RNA Genes that Modulate Gene Function. **Molecular Biotechnology**, v. 38, p. 257–268, 2008.

ZAMPETAKI, A.; KIECHL, S.; DROZDOV, I.; WILLEIT, P.; MAYR, U.; PROKOPI, M.; MAYR, A.; WEGER, S.; OBERHOLLENZER, F.; BONORA, E.; SHAH, A.; WILLEIT, J.; MAYR, M. Plasma MicroRNA profiling reveals loss of endothelial MiR-126 and other MicroRNAs in type 2 diabetes. **Circulation Research**, v. 107, n. 6, p. 810–817, 2010.

ZHAO, H.; SHEN, J.; DANIEL-MACDOUGALL, C.; WU, X.; CHOW, W.-H. Plasma MicroRNA Signature Predicting Weight Gain among Mexican-American Women. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 25, n. 5, p. 958–964, 2017.

ZHU, L.; CHEN, L.; SHI, C.; XU, G.; XU, L.-L.; ZHU, L.-L.; GUO, X.-R.; NI, Y.; CUI, Y.; JI, C. MiR-335 , an Adipogenesis-Related MicroRNA , is Involved in Adipose Tissue Inflammation. **Cell Biochemistry Biophysics**, v. 68, n. 2, p. 283–290, 2013.

ZHUANG, G.; MENG, C.; GUO, X.; CHERUKU, P. S.; SHI, L. A Novel Regulator of Macrophage Activation miR-223 in Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation. **Circulation**, v. 125, p. 2892–2903, 2012.

ANEXO A – Comprovante de aprovação no comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Saúde Pública

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação entre microRNA circulantes, biomarcadores cardiometabólicos e dieta em indivíduos adultos participantes de um estudo de base populacional - ISA-Capital

Pesquisador: Paula Nascimento Brandão Lima

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 43838621.7.0000.5421

Instituição Proponente: Faculdade de Saúde Pública USP/SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.604.086

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_1701973.pdf], de 25/02/2021.

"O estudo, apresenta delineamento transversal, de base populacional, no qual será avaliada uma subamostra de 200 indivíduos adultos, com idade de 20 a 59 anos, que participaram do Isa-Capital 2015".

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar o perfil de expressão de microRNA no plasma e verificar a relação com biomarcadores cardiometabólicos e dieta em indivíduos adultos participantes de um estudo de base populacional Isa-Capital.

Objetivos Secundários:

- Avaliar o perfil de expressão no plasma de 21 microRNA relacionados ao metabolismo glicêmico e lipídico, à obesidade e à resposta inflamatória;
- Verificar a relação entre o perfil de expressão de microRNA no plasma e o estado nutricional (índice de massa corporal e circunferência da cintura);

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: 4.604.086

- Verificar a relação entre o perfil de expressão de microRNA no plasma e o perfil lipídico;
- Verificar a relação entre o perfil de expressão de microRNA no plasma e biomarcadores glicêmicos (glicose em jejum, insulina plasmática e HOMA-IR);
- Verificar a relação entre o perfil de expressão de microRNA no plasma 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);- Verificar a interação entre o perfil de expressão de microRNA e componentes alimentares que apresentam participação na redução ou aumento do risco de desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis".

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:

Estudo nacional com dados secundários (200 participantes), com solicitação de dispensa de TCLE, o qual já foi assinado pelos participantes no estudo original (ISA-Capital 2015). A carta de anuência para acesso e uso dos dados foi apresentada.

Financiamento próprio.

Pesquisa de caráter acadêmico para obtenção do título Doutor em Ciências.

Previsão de início e de encerramento do estudo: 01/04/2021 e 01/01/2024, respectivamente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

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: 4.604.086

Recomendações:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram encontrados óbices éticos neste protocolo de pesquisa.

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 1701973.pdf	25/02/2021 12:33:31		Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	16/02/2021 19:33:40	Paula Nascimento Brandão Lima	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	16/02/2021 19:32:30	Paula Nascimento Brandão Lima	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_PaulaNBLima.pdf	16/02/2021 19:31:12	Paula Nascimento Brandão Lima	Aceito
Outros	Carta_anuencia.pdf	16/02/2021 18:27:23	Paula Nascimento Brandão Lima	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_infraestrutura_instituicao.pdf	16/02/2021 18:22:34	Paula Nascimento Brandão Lima	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada_PaulaNBLima.pdf	16/02/2021 18:14:07	Paula Nascimento Brandão Lima	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	Carta_de_encaminhamento.pdf	12/02/2021 16:23:45	Paula Nascimento Brandão Lima	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_participacao.pdf	12/02/2021 16:23:20	Paula Nascimento Brandão Lima	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_ausencia_TCLE.pdf	12/02/2021 16:22:53	Paula Nascimento Brandão Lima	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 01.248-904
 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: 4.604.086

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 22 de Março de 2021

Assinado por:

José Leopoldo Ferreira Antunes
(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 B – Currículo Lattes discente



Paula Nascimento Brandão Lima

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7849430957205232>

ID Lattes: **7849430957205232**

Última atualização do currículo em 13/10/2023

Bacharela em Nutrição e Mestra em Ciências da Saúde pela Universidade Federal de Sergipe (UFS). Doutoranda no programa de pós-graduação Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública (FSP/USP). Atua nas áreas de pesquisa de doenças crônicas não transmissíveis, micronutrientes e genômica nutricional. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Paula Nascimento Brandão Lima
Nome em citações bibliográficas	LIMA, P. N. B.; BRANDÃO-LIMA, P. N.; BRANDÃO-LIMA, PAULA NASCIMENTO; BRANDÃO-LIMA, PAULA; BRANDÃO-LIMA, PAULA N.; BRANDÃO-LIMA, P.N.; BRANDÃO LIMA, PAULA NASCIMENTO
Lattes iD	http://lattes.cnpq.br/7849430957205232
Orcid iD	https://orcid.org/0000-0002-0949-361X

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2019	Doutorado em andamento em Nutrição em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP - USP, Brasil. Título: Associação entre microRNA circulantes, biomarcadores cardiometabólicos e dieta em indivíduos adultos participantes de um estudo de base populacional - ISA-Capital Orientador: Marcelo Macedo Rogero. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
2016 - 2018	Mestrado em Ciências da Saúde. Universidade Federal de Sergipe, UFS, Brasil. Título: Polimorfismo de nucleotídeo único no gene do ZNT8 (rs11558471) e sua relação com o estado nutricional relativo ao zinco e marcadores glicêmicos em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 , Ano de Obtenção: 2018. Orientador: Kiriaque Barra Ferreira Barbosa. Coorientador: Lilliane Viana Pires. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
2011 - 2015	Graduação em Nutrição. Universidade Federal de Sergipe, UFS, Brasil. Título: BATATA DOCE (Ipomoea batatas) E MANDIOCA (Manihot esculenta Crantz) BIOFORTIFICADAS: TEORES DE PRÓ-VITAMINA A E ACEITAÇÃO POR PRÉ-ESCOLARES. Orientador: Elma Regina Silva de Andrade Wartha.
2008 - 2010	Curso técnico/profissionalizante. Instituto Federal de Sergipe, IFS, Brasil.

ANEXO C – Currículo Lattes orientador



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 Dedicção 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 Tüdisco, 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 peritoniais e o estado nutricional de camundongos, Ano de obtenção: 2007. Orientador: Julio Orlando Tirapegui Toledo. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
1999 - 2002	Mestrado em Ciências dos Alimentos. 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. Orientador: Julio Orlando Tirapegui Toledo. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Palavras-chave: Exercício; suplementação; L-glutamina; L-alanil-L-glutamina; Rato; Sistema Imune.
1991 - 1994	Graduação em Nutrição. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Orientador: Ignez salas Martins. Bolsista do(a): Coordenadoria de Assistência Social da Universidade de São Paulo, COSEAS, Brasil.

Pós-doutorado e Livre-docência

2017	Livre-docência. Faculdade de Saúde Pública, FSP, Brasil. Título: Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a expressão e a função dos receptores do tipo Toll em monócitos do sangue periférico em indivíduos obesos., Ano de obtenção: 2017.
2012 - 2013	Pós-Doutorado. University of Southampton, SOUTHAMPTON, Inglaterra. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
2007 - 2008	Pós-Doutorado. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Grande área: Ciências da Saúde