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

Efeito de uma refeição hiperlipídica no período pós-prandial sobre a expressão de microRNA em mulheres saudáveis

Bruna Jardim Quintanilha

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

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero

**São Paulo
2017**

Efeito de uma refeição hiperlipídica no período pós-prandial sobre a expressão de microRNA em mulheres saudáveis

Bruna Jardim Quintanilha

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

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero

**Versão Corrigida
São Paulo
2017**

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.

Agradecimentos

Aos meus pais, por toda a batalha em proporcionar aos seus filhos uma boa educação,
sempre com muito amor;

Ao meu orientador, prof. Marcelo Rogero, pela dedicação e excelência em ensinar seus
alunos, por inspirar sempre a busca pelo conhecimento e pela amizade;

Ao meu namorado, Marcelo Ueno, pela paciência, apoio e inspiração em toda a minha
trajetória;

Ao meu irmão, Rafael Quintanilha, pelo exemplo;

À Geni Sampaio, pelos ensinamentos, apoio e pela amizade;

Aos pesquisadores Ludmila Camargo, Frederico Ferreira e prof. Edécio Cunha, pelos
ensinamentos e parceria;

Aos alunos do grupo GENUIN, pelo aprendizado, pelos bons momentos e pela amizade;

À profa. Bernadette Gombossy e toda a equipe do *Food Research Center* (FoRC), pelo
esforço em sempre dar o melhor suporte aos seus alunos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento
da pesquisa.

Quintanilha BJ. Efeito de uma refeição hiperlipídica no período pós-prandial sobre a expressão de microRNA em mulheres saudáveis [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2017.

Resumo

Introdução - Evidências mostram que a ingestão de uma refeição hipercalórica, rica em lipídios e açúcares, provoca elevação da concentração plasmática de glicose e de triacilgliceróis (TG), bem como de lipopolissacarídeos (LPS) no período pós-prandial. Sugere-se que essa condição esteja envolvida na gênese da inflamação subclínica, caracterizada pelo aumento da concentração de biomarcadores pró-inflamatórios na circulação sanguínea, como o fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β , IL-6 e as moléculas de adesão intracelular solúvel (sICAM)-1 e vascular solúvel (sVCAM)-1, o que contribui para o aumento do risco para doenças cardiovasculares. Estudos recentes sugerem que os microRNA (miRNA) atuam como biomarcadores inflamatórios e a análise da sua expressão no período pós-prandial pode contribuir para a redução do risco de doenças cardiovasculares. **Objetivo** - Investigar o efeito de uma refeição hiperlipídica, rica em ácidos graxos saturados, sobre a expressão de microRNA e a concentração de LPS no plasma no período pós-prandial em mulheres saudáveis. **Métodos** - Realizou-se um estudo de intervenção no qual foi oferecido uma refeição matinal com alto teor de lipídios, principalmente, de ácidos graxos saturados, mais 500 mL de água, realizando-se coletas de sangue no período basal e 1, 3 e 5 horas após a ingestão da refeição hiperlipídica. A população do estudo foi composta por mulheres saudáveis ($n = 11$), com idade entre 20 e 40 anos, e IMC de 18,5 a 25 kg/m². Foram avaliadas as concentrações plasmáticas de glicose, insulina, perfil lipídico e de ácidos graxos, citocinas, moléculas de adesão, MCP-1 e LPS. Analisou-se pelo ensaio de PCR em tempo real, um perfil de expressão de 752 miRNA plasmáticos humanos. Essas análises foram realizadas em todos os tempos da coleta de sangue. **Resultados** - Houve aumento significativo das concentrações plasmáticas de LPS e TG nos tempos 1, 3 e 5 horas em relação ao período basal. As concentrações plasmáticas de insulina elevaram-se de forma significativa após 1 e 3 horas em comparação ao período basal, e reduziu após 5 h se comparado ao tempo 1 h. Os ácidos graxos saturados plasmáticos mirístico e palmítico aumentaram após o consumo da refeição. Houve aumento das concentrações plasmáticas de TNF- α após 5h se comparado ao basal e ao tempo 1 h. E houve aumento da concentração de sVCAM-1 após 5 h vs o basal. Em relação aos miRNA, 45 miRNA tiveram suas concentrações alteradas se comparadas entre todos os tempos, destes 33 miRNA vs o basal. **Conclusões** - O aumento de TG e insulina após a refeição hiperlipídica pode contribuir para explicar a participação da dieta no desenvolvimento de um quadro inflamatório, promovido, também, por um quadro de endotoxemia pós-prandial. Junto a isso, os miRNA podem exercer papel importante na regulação deste quadro. Uma refeição hiperlipídica, com elevado teor de ácidos graxos saturados, ocasiona um quadro de endotoxemia metabólica e altera a expressão de microRNA plasmáticos envolvidos na regulação do processo inflamatório no período pós-prandial.

Descritores: refeição hiperlipídica, lipídios, inflamação, pós-prandial, microRNA.

Quintanilha BJ. Effect of a high-fat meal in the postprandial period on microRNA expression in health women [dissertation]. Sao Paulo: School of Public Health (USP); 2017. Portuguese.

Abstract

Introduction – Evidence shows that a high caloric meal, rich in lipids and carbohydrates, increase glucose and triacylglycerols (TG) concentrations, furthermore in lipopolysaccharides (LPS) in the postprandial period. This condition is involved with subclinic inflammation genesis, characterized by increased concentration of inflammatory biomarkers in blood circulation, like tumor necrose fator (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6 and soluble intracellular adhesion molecule (sICAM)-1 and soluble vascular (sVCAM)-1, what contributes to rise cardiovascular disease risk. Recent studies indicate that microRNAs (miRNA) act as inflammatory biomarkers and analysis of their expression in the postprandial state could contribute to reduction of cardiovascular disease risk. **Objective** – This study investigates the high-fat high-saturated meal effect above miRNA expression and LPS concentration at the postprandial period in healthy women. **Methods** – An interventional study was carried out in which a breakfast with a high lipid content, mainly of saturated fatty acids, plus 500 mL of water was offered. Blood samples were collected at baseline and 1, 3 and 5 hours after ingestion of the high-fat meal. The study population consisted of healthy women ($n = 11$), aged between 20 and 40 years, and BMI of 18.5 to 25 kg / m². Plasma concentrations of glucose, insulin, lipid profile and fatty acids, cytokines, adhesion molecules, MCP-1 and LPS were evaluated. An expression profile of 752 human plasma miRNA was analyzed by the real-time PCR assay. These analyzes were performed at all times of blood collection. **Results** - There was a significant increase in the plasma concentrations of LPS and TG at times 1, 3, 5 hours in relation to the baseline. Plasma insulin concentrations increased significantly after 1 and 3 hours compared to baseline, and decreased after 5 h compared to 1 h. Myristic and palmitic saturated fatty acids increased after consumption of the meal. There was an increase in plasma concentrations of TNF-alpha after 5 hours compared to the baseline and at 1 h. And there was an increase in sVCAM-1 concentration after 5 hours vs baseline. Regarding the miRNA, 45 miRNA had their concentrations altered when compared among all the times, of these 33 miRNA vs the baseline. **Conclusions** - The increase of TG and insulin after the high-fat meal may contribute to explain diet participation in the development of an inflammatory condition, also promoted by postprandial endotoxemia. In addition, microRNAs may play a key role in the regulation of this condition. High-fat high-saturated meal generates a metabolic endotoxemia state and changes plasma microRNAs expression which are involved in regulation to inflammatory process in the postprandial period.

Keywords: high-fat meal, lipids, inflammation, postprandial, microRNA.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ENDOTOXEMIA METABÓLICA E INFLAMAÇÃO	4
1.2 MICRORNA	9
1.3 MICRORNA E INFLAMAÇÃO	13
1.4 MICRORNA E LIPÍDIOS	19
2 JUSTIFICATIVA	24
3 HIPÓTESE	25
4 OBJETIVO	26
5 MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	28
5.2 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO	28
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES	29
5.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO	30
5.5 REFEIÇÃO-TESTE	32
5.6 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	33
5.7 ÁCIDOS GRAXOS NA REFEIÇÃO-TESTE	34
5.8 PREPARO DO SANGUE	34
5.9 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES NO PLASMA	35
5.10 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO PLASMA	35
5.11 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE GLICOSE, PERFIL LIPÍDICO E PCR	36
5.12 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE INSULINA	36
5.13 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ENDOTOXINAS	36
5.14 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS	37
5.15 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MICRORNA	37
5.15.1 Preparação das amostras	37

5.15.2 Controle de qualidade das amostras	38
5.15.3 Análise de 752 microRNA por real-time qPCR	39
5.15.4 Replicação de 13 microRNA	39
5.15.5 Análise de dados	40
5.15.6 Análise de redes gênicas	40
5.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
6 RESULTADOS	42
7 DISCUSSÃO	65
8 CONCLUSÃO	73
9 REFERÊNCIAS	74
ANEXOS	
Anexo 1 - Cartaz de divulgação do estudo para recrutamento de voluntárias	87
Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	88
Anexo 3 - Instruções entregues às voluntárias	91
CURRÍCULO LATTES	

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Composição nutricional da refeição padrão oferecida para as participantes no dia anterior à intervenção	31
Tabela 2 – Valor calórico total e distribuição em gramas e percentual do valor calórico total de cada macronutriente da refeição-teste hiperlipídica	33
Tabela 3 – Percentual de ácidos graxos da refeição-teste	33
Tabela 4 – Características das participantes no período basal do estudo	42
Tabela 5 – Número de miRNA analisados e detectados nas amostras	55
Tabela 6 – <i>Fold-change</i> dos microRNA significativos ($p < 0,05$) de acordo com o tempo após a ingestão da refeição-teste	57
Tabela 7 – <i>Fold-change</i> dos microRNA significativos ($p < 0,05$) de acordo com o tempo após a ingestão da refeição-teste	61

Lista de Figuras

Figura 1 -	Estrutura dos lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias gram- negativas	5
Figura 2 -	Cascata de sinalização intracelular via ativação do receptor TLR4, TNFR1 e IL-beta	6
Figura 3 -	Biogênese dos microRNA e secreção	13
Figura 4 -	Refeição padrão e embalagem oferecidas para as participantes no dia anterior à intervenção	28
Figura 5 -	Delineamento do estudo	31
Figura 6 -	Refeição-teste composta por <i>croissant</i> , manteiga, <i>waffer</i> recheado com cobertura de chocolate e água	32
Figura 7 -	Média e desvio padrão das concentrações de glicose e insulina plasmáticas após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica	43
Figura 8 -	Média e desvio padrão do perfil lipídico após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica	44
Figura 9 -	Média e desvio padrão das concentrações de AGNE após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica	45
Figura 10 -	Média e desvio padrão do percentual de ácidos graxos saturados no plasma após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica	46
Figura 11 -	Média e desvio padrão do percentual de ácido graxo <i>trans</i> no plasma após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica	47
Figura 12 -	Média e desvio padrão dos percentuais de ácidos graxos mono- e poli-insaturados no plasma após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica	48
Figura 13 -	Média e desvio padrão das concentrações de proteína C reativa (PCR) após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica	49
Figura 14 -	Média e desvio padrão das concentrações plasmáticas das citocinas pró-inflamatórias – TNF- α (A), IL-6 (C), IL-18 (D), e IL-17a (E) e do TNFR (B) - após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica	50
Figura 15 -	Média e desvio padrão das concentrações plasmáticas da citocina anti-inflamatória, IL-10, após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica	51

Figura 16 -	Média e desvio padrão das concentrações plasmáticas das moléculas de adesão – sVCAM-1 (A), sICAM-1 (B) - e da quimiocina – MCP-1 (C) após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica	52
Figura 17 -	Média e desvio padrão das concentrações de lipopolissacarídeos (LPS) plasmáticos após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica	53
Figura 18 -	Correlação entre as concentrações de sVCAM-1 e TG após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica	53
Figura 19-	Cqs brutos obtidos para o controle dos ensaios por RNA <i>spike-in</i>	54
Figura 20 -	Diferenças dCq das amostras analisadas para verificação de hemólise	55
Figura 21 -	Diagrama de <i>heat map</i> com agrupamento hierárquico supervisionado dos miR com p-valor< 0,05 vs período basal	56
Figura 22 -	Diagrama de <i>Venn</i>	60
Figura 23 -	Alvos dos miRNA significativos (p<0,05 vs período basal) detectados relacionados com a via inflamatória após 1 hora da ingestão da refeição-teste hiperlipídica por mulheres saudáveis, segundo <i>mirPath</i> versão 3	62
Figura 24 -	Alvos dos miRNA significativos (p<0,05 vs período basal) detectados relacionados com a via inflamatória após 3 horas da ingestão da refeição-teste hiperlipídica por mulheres saudáveis, segundo <i>mirPath</i> versão 3	63
Figura 25 -	Alvos dos miRNA significativos (p<0,05 vs período basal) detectados relacionados com a via inflamatória após 5 horas da ingestão da refeição-teste hiperlipídica por mulheres saudáveis, segundo <i>mirPath</i> versão 3	64
Figura 26 -	Alvos do miR-145-5p referentes a via pró-inflamatória NF-kB e AP-1 segundo o <i>mirPath</i> versão 3	72

Lista de Quadros

Quadro 1 – MicroRNA envolvidos na modulação da via inflamatória pela ativação do NF- κ B	16
Quadro 2 – Regulação de proteínas-chave na ativação NF- κ B por microRNA significativos ($p < 0,05$) após a ingestão da refeição- teste hiperlipídica por mulheres saudáveis segundo o <i>software online</i> mirPath versão 3	71

1. INTRODUÇÃO

O estilo de vida moderno tem sido grande alvo de discussões entre pesquisadores e entidades públicas, no que diz respeito à saúde pública, devido à sua relação com o aumento da incidência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, obesidade e diversos tipos de câncer. Segundo relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014), 38 milhões de pessoas morreram, em 2012, por DCNT, sendo que, destas mortes, 16 milhões poderiam ter sido evitadas. Neste documento, ressaltou-se a importância da reversão deste quadro para a melhoria do desenvolvimento socioeconômico internacional e para a redução do custo de saúde gerado por estas doenças. Para isso, foram estabelecidas nove metas a serem adotadas pelos países até 2025. Dentre essas, algumas mudanças nos hábitos alimentares foram designadas, como a redução do consumo de sal, açúcar e gordura saturada e a substituição da gordura *trans* pela poli-insaturada.

Essas recomendações foram baseadas em estudos que atribuem, ao excesso de ingestão de carboidratos refinados e de ácidos graxos *trans* e saturados, os estímulos inflamatórios determinantes para o desenvolvimento da chamada “metainflamação”; ou seja, de uma inflamação crônica e de baixa intensidade, que envolve tecidos e órgãos com importante atividade metabólica, como tecido adiposo, fígado, pâncreas e hipotálamo (CORDAIN et al., 2005; GREGOR e HOTAMISLIGIL, 2011; RUIZ-NÚÑEZ et al., 2013). A metainflamação caracteriza-se pela desregulação da homeostase metabólica, resultante do aumento da concentração plasmática de citocinas com ação pró-inflamatória, do aumento do estresse oxidativo e do desenvolvimento de resistência à ação da insulina – condições, que, atualmente, estão associadas à gênese de diversas DCNT (HOTAMISLIGIL, 2006).

Carboidratos refinados e com alto índice glicêmico são os principais responsáveis pela elevação da glicemia e da insulinemia pós-prandial, enquanto a hiperlipidemia ocorre principalmente devido ao alto consumo de ácidos graxos saturados (AGS) e *trans* (GREGERSEN et al., 2012). A hiperglicemia e a hiperlipidemia pós-prandial, por sua vez, provocam estresse oxidativo, por exemplo, devido ao aumento da produção de ânion superóxido e da concentração de mediadores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias, sendo que tal fato favorece o desenvolvimento da resistência à ação da insulina e da disfunção endotelial (O'KEEFE et al., 2008).

Assim, com o intuito de demonstrar que as escolhas alimentares podem influenciar na produção de uma resposta inflamatória aguda, estudos relacionados aos efeitos pós-prandiais têm sido realizados, sendo que muitos deles investigam o efeito de uma única refeição com alto teor de lipídios sobre este quadro (EMERSON et al., 2017). DEROSA et al. (2009), em um teste de carga oral de lipídios (68% do valor calórico total), em indivíduos saudáveis, observaram aumento da resposta inflamatória pós-prandial, promovido pelo aumento da concentração plasmática da interleucina (IL)-6, fator de necrose tumoral (TNF)- α e proteína C reativa (PCR). GREGERSEN et al. (2012) verificaram, em indivíduos saudáveis entre 18 e 55 anos, aumento da concentração plasmática de triacilgliceróis e de IL-6, três horas após a ingestão de uma refeição contendo aproximadamente 80 g de lipídios.

Devido à divergência da composição das refeições-teste utilizadas neste tipo de estudo, e visando verificar se haveria disparidade entre as respostas pró-inflamatórias pós-prandiais entre os tipos de ácidos graxos, JIMÉNEZ-GÓMEZ et al. (2009) compararam três tipos de refeições hiperlipídicas com o mesmo teor de lipídios (60% do valor calórico total), mas com diferentes perfis de ácidos graxos (saturados, monoinsaturados e poli-insaturados). Estas refeições foram consumidas por homens saudáveis, os quais tiveram o sangue coletado nos momentos basal e 3, 6 e 9 horas após a ingestão da refeição. Os resultados mostraram aumento significativo da

expressão gênica do TNF- α em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) após a ingestão da refeição com alto teor de ácidos graxos saturados (35% do valor calórico total) quando comparada àquelas com maior teor de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados.

Devido à associação positiva entre ingestão de ácidos graxos saturados e risco cardiovascular (HAMMAD et al., 2016), a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2017) recomenda que a ingestão deste tipo de ácidos graxos seja inferior a 10% do valor calórico total diário. Aliada a esta diretriz, a segunda edição do Guia Alimentar Brasileiro (2014), apesar de não estipular valor máximo de ingestão de ácidos graxos saturados, alerta, em diversas partes do documento, sobre a necessidade de redução do consumo deste tipo de lipídio (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Estudos *in vitro* mostram que os AGS – em destaque, o ácido láurico (C12:0) e ácido palmítico (C16:0) – podem ativar vias inflamatórias por meio da sua ligação aos receptores do tipo Toll (TLR)-4 (WONG et al., 2009; WANG et al., 2017). Esta ligação ocorre por meio de uma glicoproteína, a fetuína A, produzida no fígado, que possui elevada afinidade com a região rica em leucina da porção extracelular do TLR-4 (PAL et al., 2012). Consequentemente, a ativação do TLR-4 desencadeia a translocação do citoplasma para o núcleo do fator de transcrição designado fator nuclear kappa B (NF- κ B), culminando no aumento da expressão de genes que codificam proteínas com ação pró-inflamatória, como o TNF-alfa, a IL-1 β , a IL-6, entre outras (LEE et al., 2001).

Aliado a este fato, dietas hiperlipídicas contendo, principalmente, ácidos graxos saturados, podem promover o quadro de disbiose intestinal, aumentando a razão entre bactérias gram-negativas e gram-positivas em curto período de tempo (CANI et al., 2007; MARTINEZ et al., 2017). As bactérias gram-negativas, por sua vez, têm, como constituinte de sua membrana externa, o lipopolissacarídeo (LPS), o qual, devido ao aumento da permeabilidade intestinal após uma refeição com alto teor de lipídios, pode se translocar em maiores quantidades do lúmen intestinal para a circulação sanguínea,

promovendo um quadro designado de endotoxemia metabólica (LAM et al., 2015). Segundo Wang et al. (2017), o LPS pode estar envolvido em respostas inflamatórias mais rápidas, se comparado aos ácidos graxos saturados, pois pequenas concentrações deste lipopolissacarídeo já são capazes de ativar os receptores TLR-4.

1.1 ENDOTOXEMIA METABÓLICA E INFLAMAÇÃO

O sistema imune inespecífico de mamíferos utiliza estratégias distintas para o reconhecimento de microrganismos; uma dessas é baseada no reconhecimento de estruturas moleculares associadas a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* — PAMP), as quais são produtos do metabolismo microbiano conservados ao longo da evolução das espécies e distribuídos amplamente entre os patógenos. Por exemplo, o modelo molecular do LPS é comum para todas as bactérias gram-negativas, porém não é produzido pelo hospedeiro (MUSHEGIAN e MEDZHITOV, 2001; TSAN e GAO, 2004). Receptores do sistema imune inato que reconhecem PAMP são denominados receptores de reconhecimento de modelos, os quais induzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, ao mesmo tempo em que ativam mecanismos de defesa antimicrobianos do hospedeiro, como a síntese de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (FUJIHARA et al., 2003; KAWAI e AKIRA, 2005).

O LPS é um componente estrutural integral e predominante da membrana externa de bactérias gram-negativas, além de representar um dos mais potentes iniciadores microbianos da inflamação (DOBROVOLSKAIA e VOGEL, 2002). O LPS é um complexo glicolipídico composto de um polissacarídeo hidrofílico e um domínio hidrofóbico denominado lipídio A (Figura 1). O lipídio A é uma estrutura altamente conservada, constituída, preferencialmente, por ácidos graxos saturados, o que lhe confere potencial pró-inflamatório. Além disso, estudos mostram perda de função na ativação da via inflamatória quando esses ácidos graxos saturados são substituídos por ácidos graxos insaturados (HWANG et al., 2016; STEIMLE et al., 2016).

O LPS ativa monócitos e macrófagos para produzirem citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12, as quais, por sua vez, atuam como mediadoras endógenas da inflamação, por meio de interações mediadas por receptores com diversas células-alvo (BEUTLER e RIETSCHER, 2003; HOEBE et al., 2006).

Figura 1 – Estrutura dos lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias gram-negativas. Adaptado de Erridge et al. (2002).

O reconhecimento, por TLR, de PAMP desencadeia a associação do TLR4 e da proteína de diferenciação mieloide 88 (MyD88), cujo fato recruta membros da família quinase associada ao receptor de IL-1 (IRAK); dois membros, IRAK4 e IRAK1, são sequencialmente fosforilados, o que promove a dissociação dos mesmos a partir do complexo receptor e a posterior associação desses com a proteína denominada fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6). A TRAF6 ativa quinases da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK/MKK), as quais podem promover a ativação do ativador da proteína-1 (AP-1), por meio da MAPK (Figura 2) (BEUTLER e RIETSCHER, 2003; BEUTLER, 2004; KAWAI e AKIRA, 2005).

No citoplasma de células não estimuladas, o NF- κ B — que se apresenta na forma de dímero — encontra-se na forma inativa devido a sua associação com

proteínas denominadas inibidores κ B (I κ B) (CAAMANO e HUNTER, 2002; LI e VERMA, 2002). O TRAF6 promove a fosforilação do complexo I κ B quinases (IKK), o qual é composto de duas subunidades catalíticas IKK α e IKK β e uma subunidade regulatória IKK γ (BEUTLER, 2004; KAWAI e AKIRA, 2005). A fosforilação do I κ B resulta na sua poliubiquitinação, a qual, por sua vez, acarreta na sua degradação mediada pelo proteossoma 26S, o que permite, desse modo, que o NF- κ B se transloque para o interior do núcleo celular e ative a transcrição de diversos genes dependentes do κ B, como genes de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Figura 2). O NF- κ B também estimula a síntese do I κ B, uma vez que a região promotora do gene que codifica para o I κ B contém sítios funcionais para o NF- κ B. Desse modo, o I κ B recém-sintetizado liga-se ao NF- κ B e suprime a sua atividade (HATADA et al., 2000; MAGNANI et al., 2000; DOBROVOLSKAIA e VOGEL, 2002; KAWAI e AKIRA, 2005).

Figura 2 – Cascata de sinalização intracelular via ativação do receptor TLR4, TNFR1 e IL-1R (DU et al., 2014).

Por meio desse mecanismo, o aumento da concentração plasmática de LPS tem sido associado à elevação do risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e metainflamação (NEVES et al., 2013). Autores divergem em relação aos valores basais desta endotoxina no sangue, porém, relacionam seu aumento com diversas alterações no metabolismo, denominando este quadro de endotoxemia metabólica. BOUTAGY et al. (2016) definiram como endotoxemia metabólica a elevação da concentração plasmática de LPS de 0,5 a 2,0 vezes em relação aos valores basais, uma vez que essa faixa de alteração está associada às alterações metabólicas.

Estudos indicam que a dieta, principalmente com alto teor em lipídios, contribui para a elevação da concentração plasmática de LPS, desencadeando, como explicado acima, a ativação de vias de sinalização relacionadas com a resposta inflamatória (ERRIDGE et al., 2007; CLEMENTE-POSTIGO et al., 2012). Diversos pesquisadores têm estudado a respeito dos mecanismos pelos quais isso poderia ocorrer. GHOSHAL et al. (2009) verificaram a participação dos quilomicrons (QM), que teriam sua produção elevada após refeições hiperlipídicas, no transporte do LPS para o plasma por meio da incorporação desta endotoxina nestas partículas. Além disso, MOREIRA et al. (2012) sugerem que grandes quantidades de QM na lâmina própria poderiam exercer pressão na barreira intestinal e, desse modo, aumentar a permeabilidade intestinal.

Outros estudos também aventam a hipótese de que a permeabilidade intestinal é a causa principal do aumento da concentração plasmática de LPS. Neste contexto, LAM et al. (2015), em um estudo realizado com ratas C57BL/6J, com seis semanas de idade, compararam duas rações hiperlipídicas, com alto teor de AGS ou ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) ômega-6, as quais foram consumidas durante 8 semanas. Apenas os animais que consumiram a ração hiperlipídica com alto teor de AGS apresentaram aumento da permeabilidade intestinal, juntamente com aumento da resistência à ação da insulina e inflamação do tecido adiposo mesentérico. Assim, esses pesquisadores concluíram que as alterações metabólicas ocasionadas pela

ingestão de lipídios divergem de acordo com o perfil de ácidos graxos predominante na alimentação.

Entretanto, MURAKAMI et al. (2016) não obtiveram os mesmos resultados quando compararam a permeabilidade intestinal e as concentrações das proteínas constituintes das *tight junctions* (zonulina -1 e -2, ocludina, claudina e molécula de adesão juncional) em ratos C57/BL6, com 5 semanas de idade, e alimentados, durante 8 semanas, com ração contendo óleo de soja (PUFA) ou banha de porco (AGS), uma vez que esses autores observaram resultados similares em relação ao aumento de permeabilidade intestinal entre os dois grupos estudados. Nesse mesmo estudo, foram analisadas as concentrações fecais de ácidos biliares, mostrando associação entre o aumento destes compostos e o aumento da permeabilidade intestinal induzido por ambas as dietas. Cabe destacar que, além dos mecanismos supracitados, outras hipóteses foram aventadas em relação à etiologia do quadro de endotoxemia metabólica, como a ativação de mastócitos na mucosa intestinal e a redução da atividade da enzima fosfatase alcalina intestinal, a qual é responsável pela degradação de LPS no lúmen intestinal (MOREIRA et al., 2012).

No tocante à cinética de alteração da concentração plasmática de LPS após a ingestão de uma única refeição, LAUGERETTE et al. (2014) ofereceram uma refeição hipercalórica (882 kcal) para oito homens saudáveis, com IMC médio de $25,8 \pm 0,8$ kg/m², idade média de $30,6 \pm 2,1$ anos, observando aumento significativo da concentração plasmática de LPS 4 horas pós-ingestão. GHANIM et al. (2010) verificaram aumento da concentração plasmática de LPS e da expressão de TLR-2 e TLR-4 em PBMC, após 3 horas da ingestão de uma refeição hipercalórica (900 kcal, sendo 51 g de lipídios e 81 g carboidratos), por indivíduos saudáveis, IMC entre 20 e 25 kg/m² e idade entre 20 e 40 anos. Estes parâmetros foram analisados nos tempos 0, 3 e 5 horas após a ingestão da refeição-teste.

Além disso, estudos evidenciam que a dieta pode estar relacionada à modulação dos processos inflamatórios, por meio de mecanismos epigenéticos, ou seja, aqueles responsáveis por modificações da expressão gênica, mas que não causam alterações na sequência do DNA. Os microRNA (miRNA) são exemplos de reguladores epigenéticos. Atualmente, sugere-se que eles sejam os novos biomarcadores para DCNT (TIJSEN et al., 2012; VAN EMPEL et al., 2012), uma vez que alguns microRNA são produzidos em tecidos-específicos e que variações no perfil de expressão plasmática de miRNA podem indicar disfunção tecidual e, conseqüentemente, condições patológicas como diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (XIAO et al., 2014).

Todavia, poucos estudos, até o momento, elucidaram o processo pelo qual os nutrientes e os compostos bioativos dos alimentos influenciam a expressão dos microRNA, bem como ainda pouco se sabe a respeito da ação de cada um deles no corpo humano (QUINTANILHA et al., 2017).

1.2 MICRORNA

A regulação da expressão gênica tem sido alvo de muitos estudos devido às possibilidades de redução do risco de DCNT (LODISH et al., 2013). Em 1993, LEE et al. verificaram a ação regulatória do microRNA *lin-4* sobre a expressão do gene *lin-14* em nematoides da espécie *Caenorhabditis elegans*. Esta descoberta trouxe à comunidade científica uma nova perspectiva de regulação da expressão gênica por meio de mecanismos pós-transcricionais, bem como uma nova forma de detectar alterações moleculares em DCNT.

Os miRNA são pequenos RNA, com aproximadamente 22 nucleotídeos, os quais não são traduzidos em proteína. Seus genes localizam-se em diversas regiões do DNA, estando dentro de um íntron ou éxon do gene (KIM e NAM, 2006; WAHID et al., 2010). A síntese inicial dos microRNA pode ocorrer de forma canônica, pela transcrição do

DNA por meio da ação da RNA polimerase II, resultando no miRNA primário (pri-miRNA), que recebe um resíduo metilado de guanilato (*cap*) e uma cauda poli-A; ou, alternativamente, por exemplo, pela formação direta do pré-miRNA após *splicing* realizado pelos *spliceossomos* de mRNA transcritos, sendo estes microRNA denominados Mirtrons (LEE et al., 2004; WELSTHOM e LAI, 2011).

Na biogênese canônica, após a transcrição, o pri-miRNA passa por duas outras etapas antes da formação do miRNA maduro. A primeira delas ocorre no núcleo, onde a enzima Drosha (RNase III) se associa à proteína ligante DGCR8 para clivar a região em forma de grampo que consistirá no pré-miRNA, o qual será, posteriormente, exportado para o citoplasma por meio da Ran-GTP exportina-5, onde sofrerá a ação da enzima Dicer (RNase III), responsável pela clivagem do laço do grampo do pré-miRNA, liberando duas fitas de RNA pareadas (miRNA:miRNA*) contendo, aproximadamente, 22 nucleotídeos (Figura 3) (CARTHEW e SONTHEIMER, 2009). Alguns miRNA podem ser clivados de forma heterogênea por Drosha e Dicer, formando os “isomiR”, que se distinguem pela adição ou depleção de um ou mais nucleotídeos em qualquer extremidade da sequência dos microRNA, classificando-se em 5’ isomiR ou 3’ isomiR ou misto (alterações em ambas extremidades). Os isomiR podem exercer diferentes funções e, até mesmo, ser produzidos de acordo com o tipo celular ou devido a uma doença específica (NEILSEN et al., 2012; TAN e DIBB, 2015). Por exemplo, GUO et al. (2016) verificaram, por meio da análise do banco de dados “The Cancer Genome Atlas”, variações da expressão de alguns isomiR (por exemplo, miR-30a), quando foram comparados diferentes tecidos e tipos de câncer.

As duas fitas de RNA pareadas são, então, reacopladas na Dicer em uma posição diferente, sendo reposicionadas pela proteína TRBP, permitindo, assim, a ligação com a proteína Argonauta (AGO) do complexo-RNA de indução de silenciamento (RISC), que se encontra em uma conformação aberta devido à ação da chaperona HSP90 (MEISTER, 2013).

Esta dupla fita de miRNA contém o miRNA maduro/ miRNA/ “5p” (originada do final 5’ da fita); e outra, fita passageira/ miRNA*/ “3p” (originada do final 3’ da fita). É o miRNA maduro que, geralmente, se associa ao complexo RISC, para então exercer a sua função, sendo a fita passageira desacoplada pela endonuclease C3PO e liberada para degradação (YE et al., 2011). Mas estudos têm observado que, em alguns miRNA, ambas as fitas podem se ligar a este complexo. Quando isso ocorre, a nomenclatura deste miRNA passa a conter em sua terminação “5p” ou “3p” – dependendo da origem da fita (YANG et al., 2011; HAMMOND, 2015).

Acoplado ao complexo RISC, o microRNA, então, dirige-se à fita do mRNA alvo, onde irá parear, total (raro em animais) ou parcialmente, sua sequência denominada “seed” com a sequência complementar do mRNA e, desse modo, regular a expressão gênica por mecanismos pós-transcricionais. A sequência “seed” possui de 2 a 8 nucleotídeos, localizados na região 5’ do microRNA, e liga-se com a sequência complementar da região 3’ não traduzida (3’ UTR) do mRNA alvo, podendo ter suporte por meio do pareamento de outra região na terminação 3’ do microRNA. Este pareamento secundário também pode ocorrer devido ao pareamento imperfeito desta região com o mRNA (AMERES e ZAMORE, 2013).

Os microRNA interferem na transcrição de genes por diferentes mecanismos: clivagem do mRNA pela AGO2, bloqueio da tradução, desestabilização do mRNA pela deadenilação e/ou retirada do *cap* e recrutamento de cofatores que podem interferir na tradução (AMERES e ZAMORE, 2013). Geralmente, os miRNA inibem a tradução do RNA mensageiro, mas estudos sugerem que eles podem, também, aumentar a eficiência deste processo, por exemplo, pela inibição de proteínas repressoras (BRUNO et al., 2011). Além disso, um estudo, realizado por ZHANG et al. (2014), mostrou a ação do miR-let-7i na ativação da transcrição devido a sua interação com o motivo *TATA-box* localizado na região promotora do gene.

Outro ponto relevante sobre a regulação por miRNA refere-se ao fato que um único microRNA pode atuar em diversos genes-alvo, bem como um mesmo RNA mensageiro pode parear com diferentes microRNA. Segundo FRIEDMAN et al. (2009), mais de 60% dos genes humanos podem ser regulados por miRNA – o que mostra a importância dos miRNA na modulação epigenética.

Os microRNA podem ser liberados no meio extracelular pela associação dos microRNA maduros ou pré-microRNA a exossomos, microvesículas, lipoproteínas ou ribonucleoproteínas, o que os protege da degradação por RNases. Segundo ARROYO et al. (2011), 90% dos microRNA não estão associados a vesículas, sendo boa parte transportados no plasma pela AGO2. Por isso, podem ser encontrados em fluidos biológicos como sangue, urina, saliva, leite materno e sêmen. Além de resistentes à ação de RNases, os microRNA também são estáveis ao aquecimento, às alterações de pH e à estocagem em longo prazo (WEBER JA et al., 2010).

Estudos indicam que a secreção dos microRNA é específica, sendo alguns microRNA produzidos apenas para a comunicação intercelular (LIANG et al., 2007; BOON e VICKERS, 2013). Neste contexto, diferentes grupos de pesquisa buscam identificar microRNA relacionados ao desenvolvimento de doenças para utilizá-los como biomarcadores (TIJSEN et al., 2012; KONDKAR e ABU-AMERO, 2015).

Figura 3 – Biogênese dos microRNA e secreção: síntese do pré-microRNA (e), produção do microRNA maduro (d) que se associará à proteína Argonauta (b) para inibição da tradução do RNA mensageiro-alvo. Os pré-microRNA e as fitas maduras podem ser transportados pela formação de exossomos originados de endossomos e microvesículas, pela protuberância da membrana plasmática. Além disso, os miRNA podem se associar às lipoproteínas (c) e às proteínas ligantes de RNA, como a AGO2 (a) (QUINTANILHA et al., 2017).

1.3 MICRORNA E INFLAMAÇÃO

A metainflamação é alvo de inúmeras pesquisas devido sua associação com as DCNT; por isso, é essencial o entendimento sobre seu mecanismo. Nesse sentido, verifica-se que o ponto-chave da resposta inflamatória ocorre com a ativação de macrófagos e células envolvidas no metabolismo intermediário, como adipócitos e hepatócitos, por meio de receptores TLR que respondem após sua ligação com

padrões moleculares associados a danos (DAMP) e a patógenos (PAMP), AGS, citocinas pró-inflamatórias, entre outros, ativando fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1 (TORNATORE et al., 2012).

Na ativação do TLR-4 por moléculas como LPS (pertencente à classe de PAMP), AGS e proteína sérica amiloide A (SAA), ocorre o recrutamento de proteínas intracelulares adaptadoras, como a MyD88, provocando a ativação da via de sinalização do NF- κ B, o que promove a ativação da transcrição de diversos genes dependentes do κ B, como genes de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6 (KARALIS et al., 2009).

Alguns estudos mostram a influência da ativação dos receptores do tipo Toll sobre a expressão de microRNA, bem como a posterior ação de alguns miRNA na via de sinalização destes receptores. Nesse sentido, JIANG et al. (2016) verificaram o efeito inibitório do miR-182-5p na etapa de tradução da síntese do TLR-4 após o tratamento de macrófagos de ratos com LPS. Concomitantemente a este resultado, os autores observaram redução da expressão gênica das citocinas TNF- α e IL-6 nestas células.

Após ativação do TLR-4, ocorre a cascata de sinalização do NF- κ B que pode ser independente ou dependente de MyD88. WENDLANDT et al. (2012) verificaram, em monócitos humanos, o papel anti-inflamatório dos miR-200b e -200c sobre a via dependente de MyD88. O mRNA do MyD88 foi descrito como um possível alvo devido à complementariedade da sua região 3'UTR com a sequência "seed" destes microRNA e a redução da sua expressão após a mimetização da ação destes miRNA sobre estas células. Junto a isso, colaborando com estes resultados, observaram, após 3 horas do tratamento dos monócitos com LPS, a redução da expressão do TNF- α e da IL-6.

Seguindo a via do TLR-4/NF- κ B, o MyD88 é responsável pelo recrutamento da proteína IRAK-4, a qual, também, pode ser modulada por microRNA, como mostraram LV et al. (2016), em um estudo *in vitro* com microglias de camundongos, no qual

verificou-se a ação inibitória do miR-27a sobre a expressão do IRAK4 e do receptor TLR-4 após estímulo com LPS. Em estudo anterior, NAHID et al. (2013), estimulando monócitos THP-1 humanos com diferentes PAMP, observaram que o miR-132 também tem como alvo a quinase IRAK-4, sendo a expressão deste microRNA mais estimulada pela ativação dos receptores TLR-2 por proteoglicanos (PGN) em comparação à ativação do TLR-4 mediada por LPS. A IRAK-4, por sua vez, fosforila IRAK-1, que ativa a TRAF-6, proteína-chave para ativação do NF- κ B, pois pode ser ativada por vias dependentes ou independentes de MyD88. Em estudo realizado em monócitos do sangue periférico, foi identificada a repressão pós-transcricional destas proteínas pelo miR-146, o qual exerceu *feedback* negativo da ativação desta via após seu aumento de expressão induzido por LPS. Neste mesmo estudo, verificou-se que miR-132 e miR-155 também tiveram suas expressões elevadas após o tratamento com LPS (TAGANOV et al., 2006).

Outros mecanismos indiretos dos microRNA na via inflamatória do NF- κ B foram descritos, como no caso do miR-21, que atenua a resposta inflamatória causada pela ativação desta via por meio da inibição da proteína PDCD4, que, além de ativar este fator de transcrição por mecanismos ainda não elucidados, inibe a produção da citocina anti-inflamatória designada IL-10 (SHEEDY et al., 2010). Estudo realizado em monócitos humanos mostrou que o miR-30a tem como alvo o fator de transcrição STAT-1, o qual é responsável pela ativação transcricional do gene codificador de um ligante de LPS (MD-2). Além disso, os pesquisadores observaram que o estímulo dessas células com LPS provoca aumento da expressão de IL-10, concomitantemente com a de MD-2, sendo justificado pela ativação de STAT1 por esta citocina (WANG et al., 2014).

Ainda sobre a relação LPS e microRNA, um estudo de cinética, realizado por MOSCHOS et al. (2007), analisou 104 microRNA e detectou aumento significativo da expressão de 46 microRNA nos tempos 1, 3 e 5 horas após a ativação de células pulmonares com LPS, sendo a expressão dos miR -21, -25, -27b, -100, 140, -142-3p, -

181c, 187, -194, -214, -223 e -224 elevadas progressivamente em todos os tempos. Em um estudo mais recente, foram detectados, pelo método de sequenciamento, 67 miRNA com expressão alterada após o tratamento de células-tronco mesenquimais humanas com LPS (WANG et al., 2016). Seguem, no Quadro 1, os microRNA envolvidos com a via inflamatória do NF- κ B.

Quadro 1 – MicroRNA envolvidos na modulação da via inflamatória pela ativação do NF- κ B.

Quadro 1 – MicroRNA envolvidos na modulação da via inflamatória pela ativação do NF- κ B.				
MicroRNA	Regulação por LPS	Possíveis Alvos	Células	Referências
miR-146	Upregulated	IRAK-1; TRAF-6	Monócitos (humanos)	(TAGANOV et al., 2006)
miR-132		IRAK-4	Monócitos (humanos)	(TAGANOV et al., 2006)
miR-155				(NAHID et al., 2013)
miR-200b	NA	MyD88	Monócitos (humanos)	(WENDLANDT et al., 2012)
miR-200c				
miR-27a	Downregulated	TLR-4; IRAK-4	Microglia (camundongos)	(LV et al., 2016)
miR-21	NA	PDCD4	Mononucleares (humanos)	(SHEEDY et al., 2010)
		NA	Pulmonares (camundongos)	(MOSCHOS et al., 2007)
miR-155	Upregulated	FADD, IKK ϵ , Ripk1	Macrófagos (camundongos)	(TILI et al., 2007)
miR-125b	Downregulated	TNF- α		
miR-182-5p	NA	TLR-4	Macrófagos (ratos)	(JIANG et al., 2016)
miR-146b	Downregulated	NA	Leucócitos (humanos)	(SCHMIDT et al., 2009)
miR-150				
miR-342				
miR-let-7g				
miR-143	Upregulated			
miR-25	Upregulated	NA	Pulmonares (camundongos)	(MOSCHOS et al., 2007)
miR-27b				
miR-100				
miR-140				
miR-142-3p				
miR-181c				
miR-187				
miR-194				
miR-214				
miR-223				
miR-224				

Legenda: NA – não analisado.

Como supracitado, a ativação do fator de transcrição NF- κ B por LPS ou AGS está relacionada ao aumento de risco e progressão de doenças cardiovasculares, sendo a fisiopatologia dessas doenças reguladas por microRNA. A participação dos microRNA na regulação deste processo ocorre desde a diapedese de monócitos até a síntese de citocinas por macrófagos (HULSMANS et al., 2011). Por exemplo, o miR-21, quando superexpresso, relacionou-se ao aumento da produção de óxido nítrico e da fosforilação da enzima de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), por vias ainda não elucidadas (WEBER M et al., 2010); já o miR-126 e o miR-124a interferem na diapedese dos monócitos por terem como alvo a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e a quimiocina CCL2, respectivamente (HARRIS et al., 2008; NAKAMACHI et al., 2009).

A polarização de macrófagos pode ser regulada por microRNA. O miR-let-7c mostrou ser mais expresso em macrófagos do subtipo M2, responsável pela produção de citocinas anti-inflamatórias. Cabe destacar que macrófagos do tipo M2 *knockout* de miR-let-7c apresentam aumento da polarização para o fenótipo M1, pró-inflamatório (BANERJEE et al., 2013). ZHANG et al. (2013), analisando 109 microRNA diferentemente expressos nas duas linhagens de macrófagos, verificaram maior expressão dos miR-143-3p, -145-5p, -125-5p, -146-3p no subtipo M2.

O miR-155 é um dos microRNA mais estudados e, devido aos seus diferentes alvos, pesquisadores têm encontrado dificuldade de classificar sua ação como anti- ou pró-inflamatória. Neste sentido, WU et al. (2014), em experimento *in vitro* com linfócitos T e células endoteliais humanas tratadas com TNF- α , verificaram que a subunidade p65 do NF- κ B representa um dos alvos do miR-155. Em contrapartida, YANG et al. (2015) observaram, em macrófagos estimulados por LDL oxidada (oxLDL) e em modelo de camundongos com quadro aterosclerótico, uma ação pró-aterogênica do miR-155, na qual este microRNA teria como alvo o supressor de sinalização de citocinas (SOCS)-1, o que provocaria aumento da expressão de TNF- α , IL-1 β e quimiocinas.

A obesidade representa um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares – e um dos mecanismos propostos de ação refere-se ao aumento da resposta inflamatória no tecido adiposo.

Neste sentido, GE et al. (2014) verificaram ação de microRNA na modulação do processo inflamatório neste tecido, também por meio da regulação via TLR4-NFkB. A obesidade caracteriza-se pela expansão do tecido adiposo por hipertrofia e hiperplasia de adipócitos. A disfunção deste tecido é a chave para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória e pode iniciar-se devido a um conjunto de fatores, como hipóxia, estresse do retículo endoplasmático, lipotoxicidade e endotoxemia metabólica (GE et al., 2014). No caso da hipóxia, alguns microRNA já foram descritos, na literatura, como auxiliares deste quadro, devido à sua regulação da adipogênese – processo que contribui para redução do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, para redução do fornecimento de oxigênio no tecido adiposo. O miR-21 e o miR-342 estimulam a adipogênese por meio da inibição do TGF- β (KIM et al., 2009; WANG et al., 2015), enquanto o miR-143 promove a diferenciação dos adipócitos, devido ao seu alvo estar envolvido na sinalização das MAPK (CHEN L et al., 2014), assim como o miR-375 exerce o mesmo efeito, porém via ERK (LING et al., 2011).

A lipotoxicidade consiste no aumento da quantidade de ácidos graxos livres, os quais podem ativar a resposta inflamatória por meio da via de sinalização TLR4-NFkB. LORENTE-CEBRIAN et al. (2014) verificaram a ação do miR-145 em adipócitos humanos diferenciados, na ativação da enzima lipase hormônio sensível (LHS). Quanto ao estresse do retículo endoplasmático, pesquisadores têm verificado ação dos miR-23a, -27a e -24-2 na ativação deste processo, sendo que os miR-214 e -30c-2-3p contribuem para estimulação deste processo por meio da ativação do NF-kB (MAUREL e CHEVET, 2013; BYRD e BREWER, 2013).

Além disso, destaca-se que o tecido adiposo é um órgão secretor, pois produz inúmeros peptídeos e proteínas, denominados adipocinas, com ações parácrina,

autócrina e endócrina. A adiponectina é uma adipocina com ação anti-inflamatória e sua concentração plasmática está reduzida em indivíduos obesos. Um estudo com pré-adipócitos de camundongos mostrou o aumento da expressão do miR-889-5p, cuja expressão é reduzida em obesos, após tratamento com adiponectina. Neste mesmo estudo, os pesquisadores observaram a inibição, por este miRNA, da proteína ligante de lipopolissacarídeo (LBP), a qual participa da ativação do TLR4 (GE et al., 2012).

1.4 MICRORNA E LIPÍDIOS

O estudo de nutrientes e compostos bioativos dos alimentos (CBA) e suas interações com o balanço “saúde e doença” é uma área de estudo crescente. Pesquisas têm evidenciado alterações epigenéticas, como acetilação de histonas e metilação de DNA, induzidas por intervenções nutricionais. Todavia, poucos estudos mostraram os potenciais efeitos da alimentação em relação à expressão de microRNA.

Na base de dados PUBMED (acessada em 6 de novembro de 2017), quando a pesquisa é realizada com os termos “microRNA and diet”, apenas 818 artigos são identificados, sendo 147 artigos de revisão. Um deles, publicado em 2014, por ROSS e DAVIS, identificou que grande parte dos estudos sobre este tema é realizado em células, mostrando a necessidade da utilização de outros modelos experimentais para melhor elucidação dos mecanismos relacionados à regulação dos microRNA por nutrientes e CBA.

Dentre os estudos *in vitro*, alguns mostraram a ação de ácidos graxos sobre o perfil de microRNA em células. Nesse sentido, XU et al. (2014) verificaram o efeito dos ácidos graxos láurico, linoleico, oleico e araquidônico, em adipócitos humanos, sobre a expressão do miR-26b, a qual aumentou na presença destes ácidos graxos. Os AGS — em especial, os ácidos palmítico e esteárico — estão relacionados ao desenvolvimento da resistência à ação da insulina e ao aumento da resposta inflamatória via estresse do retículo endoplasmático e ativação das vias de sinalização do NF- κ B e do AP-1

(LEGRAND-POELS et al., 2014). Estas condições estão relacionadas à ativação da resposta inflamatória induzida pela obesidade, que, segundo os mesmos autores, tem seus mecanismos regulados pelo miR-26b.

YANG et al. (2014a, b; 2016a, c) investigaram os efeitos do AGS palmítico em hepatócitos (HepG2) e miócitos (L6 GLUT4myc) humanos sobre a expressão de miRNA. A administração de palmitato em hepatócitos acarretou no aumento da expressão de miR-96, miR-1271 e miR-195. Os autores verificaram que tanto o miR-96 quanto o miR-1271 tinham como alvo o substrato do receptor de insulina (IRS)-1, enquanto o mRNA do receptor de insulina (INSR) era alvo apenas do miR-96. Já, em se tratando de miócitos, o palmitato promoveu aumento do miR-29a, responsável pela inibição pós-transcricional do IRS-1. Assim, diante desses estudos, verifica-se o papel dos ácidos graxos saturados no prejuízo da via de sinalização da insulina por meio de mecanismos epigenéticos.

DAIMIEL-RUIZ et al. (2015) avaliaram o efeito de micelas contendo colesterol, ácido docosaenoico (DHA) e ácido linoleico conjugado (CLA) sobre a expressão de microRNA em enterócitos humanos. Os resultados evidenciaram que 29 miRNA foram diferencialmente regulados a partir da análise das três intervenções. Além disso, o miR-107 se destacou por ser o único microRNA que foi alterado nas três intervenções; bem como, em um experimento posterior com ratos submetidos à ração hiperlipídica, apresentou modulação diferenciada no intestino e no tecido adiposo e ausência de alteração da sua expressão no órgão onde este miRNA é mais expresso, o cérebro.

A ração hiperlipídica é muito utilizada para o desenvolvimento de modelos animais de obesidade. Estudos envolvendo miRNA têm utilizado esses modelos experimentais para verificar os potenciais efeitos de miRNA sobre o desenvolvimento desta doença e das possíveis complicações ocasionadas por este quadro – como a ocorrência da resistência à ação da insulina e doenças cardiovasculares. Assim,

poucos estudos têm como foco principal a avaliação dos efeitos de um padrão alimentar com alto teor de lipídios ou de ácidos graxos sobre a expressão de microRNA.

Diante deste fato, CHARTOUMPEKIS et al. (2012) visaram identificar os possíveis miRNA alterados após uma intervenção de cinco meses com ração hiperlipídica em camundongos. Observaram, após análise do tecido adiposo branco destes animais, 26 microRNA diferencialmente expressos, sendo alguns reduzidos (entre eles, miR-30a) e outros aumentados (por exemplo, miR-342-3p, -146a e -21) após a ingestão da ração. Segundo os autores, a maior parte dos microRNA detectados está envolvida com a adipogênese e a diferenciação celular, sendo apenas o miR-146a (homólogo do miR-146b) relacionado com a regulação da resposta inflamatória.

YANG et al. (2016b), em análise de expressão de microRNA por *microarray*, a partir de amostras de fígados de ratos (alimentados com ração hiperlipídica, durante 12 semanas), verificaram alteração de expressão em mais de 200 microRNA. Dentre aqueles envolvidos na via de sinalização da insulina, particularmente tendo como alvos IRS-1 e INSR, verificaram-se diversos miRNA cuja expressão foi elevada após o aumento da ingestão de lipídios.

GUEDES et al. (2016), visando identificar, em camundongos machos C57BL/6, com quatro semanas de idade, a regulação dos microRNA no quadro de hipertrofia cardíaca e sua relação com o consumo de uma ração contendo 40% ou 60% de lipídios, observaram, principalmente, o aumento do conteúdo de alguns miRNA neste tecido, sendo que, destes, assim como no estudo anterior, uma parte estava envolvida na regulação da captação de glicose.

Ainda em modelos animais, TAKANABE et al. (2008) verificaram, no tecido adiposo de camundongos, aumento da expressão do miR-143 após ingestão de uma ração contendo 45% do valor calórico total oriundos de lipídios, durante período de oito semanas. A expressão deste microRNA correlacionou-se de forma positiva com as

expressões de PPAR- γ e aP2. Ambas as proteínas estão envolvidas na diferenciação de pré-adipócitos, enquanto o PPAR- γ também se relaciona com a regulação da via de sinalização do NF- κ B, por inibir esse fator de transcrição por um mecanismo transrepressional (REMELS et al., 2009). O PPAR- γ é um dos possíveis alvos do miR-27a que teve sua expressão reduzida no tecido adiposo de ratos após o mesmo período de ingestão de uma ração hiperlipídica. Entretanto, neste mesmo estudo, observou-se que este microRNA teve sua expressão sérica aumentada após a intervenção, mostrando que há diferenças na expressão deste miRNA no sangue e no tecido adiposo (YAO et al., 2017).

Em se tratando de estudos realizados em humanos, são raros os trabalhos que envolvem microRNA e intervenções nutricionais. Em estudo de intervenção com 30 indivíduos saudáveis, os quais consumiram 30 g/dia de amêndoas e nozes — alimentos fontes de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) —, durante 8 semanas, verificou-se alteração de 11 microRNA no plasma. Dentre eles, tiveram sua expressão reduzida os miR-328, miR-330-3p, miR-221 e miR-125a-5p, enquanto os miR-192, miR-486-5p, miR-19b, miR-106a, miR-130b, miR-18a e miR-769-5p tiveram aumento de expressão após a intervenção. O miR-106 destacou-se pela associação positiva à concentração plasmática de PUFA, enquanto as alterações nas concentrações plasmáticas de AGS e MUFA foram associadas ao aumento da expressão do miR-130b (ORTEGA et al., 2015).

DESGAGNÉ et al. (2016) visaram identificar, em nove homens saudáveis, os efeitos de duas dietas com alto teor de ácidos graxos *trans* (C18:1 *trans* – ácido elaídico), as quais diferiam pela origem (industrial ou ruminantes) deste tipo de AG, sobre a expressão plasmática dos miR-135a-3p e miR-223-3p. Como resultado, os autores observaram que ambas as dietas promoveram aumento da expressão desses microRNA; entretanto, a correlação entre os demais parâmetros analisados e os microRNA divergiu entre elas. Na dieta com alto teor de AG *trans* de origem industrial, o miR-223-3p teve associação negativa com a concentração plasmática de HDL-c;

enquanto, no miR-135a-3p, a associação foi positiva com a concentração plasmática de triacilgliceróis. Já na dieta rica em AG *trans* proveniente de ruminantes, verificou-se associação positiva entre o miR-223-3p e concentração plasmática de PCR e miR-135a-3p e a concentração de triacilgliceróis associada à LDL. Segundo VICKERS et al. (2011), miR-223-3p e miR-135a-3p são carregados pela HDL, sendo o miR-223-3p mais abundante em pacientes com hipercolesterolemia familiar e o miR-135a-3p, em indivíduos saudáveis.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que humanos gastam mais de três-quartos de suas vidas no estado pós-prandial, grande importância tem sido dada ao aumento da resposta inflamatória no período pós-absortivo nos últimos anos. Estudos mostram que o aumento da concentração plasmática de triacilgliceróis, quilomicrons remanescentes e apolipoproteína (apo) B, não apenas no jejum, mas também no período pós-prandial, são fatores de risco independentes relacionados ao risco cardiovascular. O LPS também está envolvido no aumento deste risco, sendo que sua concentração plasmática sofre influência da alimentação.

Os microRNA possuem relação com a modulação da resposta inflamatória em diversas DCNT, e uma das vias pelas quais os miRNA promovem este controle é a do LPS-TLR4-NF-kB (Quadro 1). Além disso, estudos mostram que a expressão plasmática de microRNA pode refletir o estado fisiológico dos tecidos, sendo sua secreção pelas células importante para a comunicação célula a célula. Assim, diante dos fatos supracitados, verifica-se a importância de estudos envolvendo os efeitos pós-prandiais sobre a endotoxemia metabólica e sua relação com a expressão de microRNA, os quais podem representar potenciais biomarcadores da resposta inflamatória pós-prandial.

3. HIPÓTESE

A refeição hiperlipídica, rica em ácidos graxos saturados, é capaz de aumentar a concentração plasmática de LPS e modular a expressão plasmática de microRNA cujos alvos estão relacionados com a resposta inflamatória.

4. OBJETIVO

Verificar o efeito de uma refeição hiperlipídica na expressão de microRNA plasmáticos relacionados à resposta inflamatória e na concentração plasmática de LPS no período pós-prandial em mulheres saudáveis.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi intervencional e realizado no Centro de Saúde Escola Geraldo de Paula Souza - CSEGPS, o qual está localizado na cidade de São Paulo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 21959413.1.0000.542) da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, em dezembro de 2013.

O recrutamento dos voluntários ocorreu por meio de cartazes distribuídos pelo campus da Universidade de São Paulo e por meio de anúncios no seu jornal eletrônico (www.jornal.usp.br) (Anexo 1). Foram selecionadas apenas voluntárias do sexo feminino pois a população da região onde foi realizado o estudo era, predominantemente, composta por mulheres, se tratando desta forma de uma amostra de conveniência. Os indivíduos interessados em participar do estudo foram convocados para uma entrevista, na qual foi verificado se cada interessado atendia aos critérios de inclusão previamente estabelecidos, bem como foram aferidas as medidas antropométricas e a pressão arterial. Posteriormente, as voluntárias receberam instruções a respeito do delineamento do estudo, sendo esclarecida qualquer tipo de dúvida, e foi entregue um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 2). Após a assinatura do TCLE, foi agendada uma data para realização da intervenção, bem como as voluntárias foram orientadas em relação às condições anteriores a este dia como, por exemplo, necessidade de ausência de prática de atividade física e de ingestão de álcool 48 h e 7 dias antes do estudo, respectivamente.

Cálculo amostral

O estudo foi delineado para fornecer um poder estatístico de 80% (β de 10%) para detectar uma diferença de 30% no aumento da concentração plasmática da IL-6 após a ingestão da refeição com alto teor de lipídios, considerando α de 5% bilateral.

Neste sentido, foi estimado um tamanho de amostra de 8 indivíduos para testar a hipótese primária relacionada à concentração plasmática de IL-6. Todavia, considerando um percentual médio de 25% de desistência de participação do protocolo experimental por parte das voluntárias, foi adotado um tamanho de amostra de 10 indivíduos.

5.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Sexo feminino;
- Idade entre 18 a 40 anos;
- Índice de massa corporal (IMC) entre 18,5 e 25,0 kg/m²;
- Estar disposta a aderir ao protocolo de estudo;
- Estar disposta a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

5.2 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO

- Sexo masculino;
- Idade inferior a 18 anos e superior a 40 anos;
- IMC < 18,5 kg/m² ou > 25,0 kg/m²;
- Ser atleta;
- Diagnóstico de diabetes melito;
- Fazer uso de medicação prescrita para controlar inflamação;
- Fazer uso de medicação prescrita para perfil lipídico plasmático;
- Fazer uso de medicação prescrita controlar a pressão arterial sistêmica;
- Fazer uso de qualquer tipo de suplemento nutricional;
- Ter ingerido álcool 7 dias antes do experimento;
- Ser tabagista;
- Possuir algum problema gastrointestinal crônico (por exemplo, doença inflamatória intestinal, doença celíaca, câncer);

- Diagnóstico de hipotireoidismo não tratado;
- Ser gestante ou nutriz;
- Estar participando de outro estudo;
- Ter praticado exercício físico 48 horas antes da realização do estudo.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES

Um questionário foi aplicado para confirmação da adequação das interessadas quanto aos critérios de inclusão e exclusão. O peso corporal foi aferido utilizando balança de plataforma digital, com precisão mínima de 100 g. O equipamento foi posicionado em superfície lisa e nivelada. A estatura foi realizada em estadiômetro com precisão de 0,5 cm. O participante estava descalço, ereto e sem adornos e acessórios. As medidas foram realizadas duas vezes e o valor considerado foi a média aritmética entre as duas medidas. A partir dos dados de peso e estatura foi calculado o IMC e classificado segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 1995). A circunferência da cintura foi medida com o indivíduo ereto, braços relaxados ao lado do corpo, pés juntos e abdômen relaxado e a região medida livre de roupas. O ponto de medição utilizado foi o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. A pressão arterial foi aferida por aparelho digital da marca Omron®, com o voluntário sentado e com o braço apoiado, sendo o resultado obtido pela média aritmética entre três medidas.

5.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

No dia anterior à intervenção, as participantes receberam uma refeição padrão balanceada em macronutrientes (Figura 4 e Tabela 1), que correspondia à última refeição antes do início do jejum de 12 horas. No momento da entrega da refeição, as voluntárias eram orientadas quanto ao horário limite da ingestão da refeição, recebendo também as instruções por escrito (Anexo 3).

Figura 4 – Refeição padrão e embalagem oferecidas para as participantes no dia anterior à intervenção.

Tabela 1 – Composição nutricional da refeição padrão oferecida para as participantes no dia anterior à intervenção.

Ingredientes	Peso (g)	Energia (kcal)	Carboidratos (g)	Proteínas (g)	Lipídios (g)
Pão tipo tortilha	80	218	38,00	5,60	4,40
Peito de Peru	30	32	0,50	6,00	0,80
Queijo Prato	40	145	1,87	10,60	10,53
Alface crespa	20	2	0,34	0,26	0,04
Cenoura crua ralada higienizada	12	4	0,92	0,16	0,04
Água de coco	*200	45	11,00	0,00	0,00
Barra de cereal (sabor banana)	22	79	17,00	1,00	0,50
Maçã	100	56	15,20	0,30	0,00
Total	-	581	84,83	23,92	16,31

* valor em mililitros (mL). Fonte: Tabelas nutricionais oferecidas pela empresa comercializadora; TACO, 2011.

No dia seguinte, às 7:30 h da manhã, foram coletados, através de um acesso instalado, 20 mL de sangue de cada voluntária. Posteriormente, a voluntária recebeu uma refeição-teste juntamente com 500 mL de água. A refeição-teste e a bebida foram consumidas entre 15 a 20 minutos. Após o término da ingestão da refeição-teste, foram coletados 20 mL de sangue em cada um dos seguintes tempos: 1, 3 e 5 horas pós-refeição. Segue abaixo o delineamento do estudo (Figura 5).

Figura 5 – Delineamento do estudo.

5.5 REFEIÇÃO-TESTE

A refeição matinal foi elaborada com a finalidade de prover alta ingestão de lipídios (Figura 6 e Tabela 2 e 3) e, principalmente, de ácidos graxos saturados. A refeição foi composta de *croissant* recheado com manteiga e queijo prato, *waffer* recheado com cobertura de chocolate e 500 mL de água.

Figura 6 – Refeição-teste composta por *croissant*, manteiga, *waffer* recheado com cobertura de chocolate e água.

Tabela 2 – Valor calórico total e distribuição em gramas e percentual do valor calórico total de cada macronutriente da refeição-teste hiperlipídica.

Valor calórico (Kcal)	Lipídios		Carboidratos		Proteínas	
	%	g	%	g	%	g
1067,45	53,87	63,89	37,31	99,58	8,63	23,03

Tabela 3 – Percentual de ácidos graxos da refeição-teste.

Ácidos graxos (refeição teste)	%
Butírico (C4:0)	64,82
Caproico (C6:0)	0,18
Caprílico (C8:0)	0,13
Cáprico (C10:0)	0,39
Láurico (C12:0)	0,70
Mirístico (C14:0)	2,51
Miristoléico (14:1)	0,18
Pentadecanóico (C15:0)	0,24
Palmítico (C16:0)	14,54
Palmitoléico (C16:1)	0,32
Esteárico (C18:0)	5,11
Elaídico (C18:1 n9-trans)	9,05
Linoléico (C18:2 n6)	1,58
Linolênico (C18:3 n3)	0,20
Aracdônico (C20:4 n6)	0,13
cis-13,16 Docasodienóico (C22:2)	0,50

5.6 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Os teores de umidade, proteínas, lipídios e cinzas foram determinados, conforme métodos descritos pela *Association of Official Analytical Chemists* – AOAC (1995). Os carboidratos foram calculados pela diferença entre peso total da amostra e a somatória do peso da umidade, cinzas, lipídios e proteínas.

5.7 ÁCIDOS GRAXOS (AG) NA REFEIÇÃO TESTE

A extração dos lipídios das amostras foi realizada de acordo com o método de (BLIGH e DYER, 1959). Os AG foram transformados em éster metílico de ácido graxo (EMAG) por meio da reação de transesterificação proposta por Hartman e Lago (1973). Cerca de 50 mg do lipídio foram diluídos com n-hexano e saponificado com solução de NaOH (0,5 mol/L, em metanol) a 60°C, em seguida foram esterificados com “reagente de esterificação” (contendo cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico) na mesma temperatura. Solução saturada de cloreto de sódio foi adicionada e a fase orgânica (superior) diluída na proporção de 1:4 com n-hexano, separada em vial e, então, submetida à análise cromatográfica.

O padrão e as amostras foram analisados em cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama e injetor *split/splitless*, modelo GC-2010, marca *Shimadzu*. As condições cromatográficas aplicadas foram: gás de arraste: hidrogênio, fluxo constante: 0,27 mL/min, volume de injeção: 1,0 µL, temperatura do injetor: 250°C, temperatura do detector: 260°C, razão de divisão da amostra: 1:350. A separação dos compostos ocorreu em uma coluna capilar de sílica fundida (15 m x 0,1 mm, 0,1 µm, DB-FFAP, J&W Scientific, Agilent) com programação de temperatura: 100 °C (1 min); 45 °C/min até 155 °C (21 min); 15 °C/min até 240 °C (1 min); 1,5 °C/min até 243 °C (1 min). Os compostos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com o padrão. O padrão utilizado foi uma mistura de 37 ésteres metil de ácidos graxos (FAME 37, código 47885, Sigma Chemical Co).

5.8 PREPARO DO SANGUE

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo (i) anticoagulante EDTA (15 mL), (ii) fluoreto de sódio (2 mL) e (iii) gel separador (4 mL). Após a coleta, o sangue foi cuidadosamente homogeneizado e, imediatamente, centrifugado a 1.200 g (centrífuga *Hitachi* – Modelo CTSE, Singapura), por 15 minutos,

em temperatura ambiente. Os tubos de sangue contendo EDTA foram utilizados para avaliar o perfil lipídico, concentrações plasmáticas de insulina e LPS e o perfil de expressão de microRNA. A partir dos tubos de sangue contendo fluoreto de sódio e gel separador, foram determinadas as concentrações de glicose e de PCR, respectivamente. Todas as amostras foram armazenadas em freezer a -80 °C.

5.9 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (AGL) NO PLASMA

A concentração de ácidos graxos não-esterificados no plasma foi analisada pelo kit comercial *Free Fatty Acid Quantification* (RANDOX, Laboratories Ltd., Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim, Reino Unido).

5.10 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO PLASMA

A etapa de extração dos AG do plasma foi realizada pela adição de 1 mL de solução metanol/clorofórmio, seguida de centrifugação a 20.000 rpm por 20 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo PYREX. Esse procedimento foi repetido três vezes, sendo os sobrenadantes obtidos em cada lavagem agregados e secos em concentrador de amostras. Após passarem pelo procedimento de secagem, as amostras foram submetidas a etapa de esterificação dos AG. Essa etapa consiste na adição de 0,5 mL de hexano e 125 µL de metóxido de sódio seguida de sonicação por 20 min. Em seguida, adicionou-se 2,5 mL de solução de NaCl saturada, sendo a amostra mantida em repouso por 10 min. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de hexano seguido por agitação em vortex durante 30 segundos. O sobrenadante foi recolhido e a extração foi repetida 4 vezes. Após completa secagem, as amostras, agora contendo AG esterificados, foram ressuspensas em 0,25 mL de hexano HPLC, sonicadas durante 5 min e filtradas (Millipore 0,22 µm) diretamente no vial e, posteriormente, injetadas no cromatógrafo à gás para detecção de ionização de chama.

O perfil de ácidos graxos foi determinado em cromatógrafo a gás *Shimadzu*, CG-2010 e as condições aplicadas foram: gás de arraste: hidrogênio, fluxo constante: 0,27 mL.min⁻¹, volume de injeção: 1,0 µL, temperatura do injetor: 250 °C, temperatura do injetor: 260 °C, razão de divisão da amostra: 1:150. Para a separação dos compostos, foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida (15 m x 0,1 mm, 0,1 µm, DB-FFAP, *J&W Scientific da Agilent Technologies*). Os compostos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com o padrão. O padrão utilizado foi uma mistura de 37 ésteres metil de ácidos graxos (FAME 37, *Sigma Chemical Co*). Os resultados foram expressos como percentual total de ácidos graxos presentes na amostra.

5.11 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE GLICOSE, PERFIL LIPÍDICO E PCR

O perfil lipídico e as concentrações plasmáticas de glicose e PCR foram determinadas por meio de *kits* comerciais (Labtest Diagnóstica S/A®, Minas Gerais, Brasil), por meio de métodos enzimáticos e colorimétricos, de acordo com as recomendações do fabricante.

5.12 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE INSULINA

A concentração plasmática de insulina foi determinada por meio de *kit* comercial (*Insulin Accubind Elisa Kit*; *Monobind Inc, Lake Forest, EUA*), fundamentado pela técnica de imunoensaio.

5.13 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ENDOTOXINAS

A concentração plasmática de LPS foi determinada por meio de *kit* colorimétrico (*Limulus Amebocyte Lysate kit*; *Lonza Inc, Walkersville, EUA*).

5.14 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS

As concentrações plasmáticas de IL-6, IL-8, IL-10, IL-17a, TNF-alfa, receptor do fator de necrose 1 (TNFR1), MCP-1, sICAM-1 e sVCAM-1 foram determinadas por meio de imunoensaio multiplex, com uso do *kit* comercial *Magnetic Luminex Assay* (R&D systems, Minnesota, EUA).

5.15 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MICRORNA NO PLASMA

Todos os experimentos foram conduzidos pela empresa *Exiqon* localizada em *Vedbaek* (Dinamarca). O transporte das amostras foi de forma aérea, sendo acondicionadas em isopor com gelo seco e com monitorização da temperatura durante todo o percurso.

5.15.1 Preparação das amostras

RNA total foi extraído do plasma usando o *kit miRCURY™ RNA isolation-biofluids* (*Exiqon, Vedbaek, Dinamarca*). O plasma foi descongelado e centrifugado a 3.000 g, por 5 minutos, a 4 °C. Uma alíquota de 200 µL de plasma foi transferida para um microtubo e adicionados 60 µL de solução de lise (Tris 10 mM, 0,001% Tiocianato de Guanidina e proteinase K). Os tubos foram homogeneizados e incubados por 3 min, em temperatura ambiente, seguido da adição de 20 µL da solução de precipitação de proteínas e, posteriormente, homogeneizados e incubados por 1 min, em temperatura ambiente, e centrifugados a 11.000 g por 3 min. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 2 mL, sendo que 270 µL de isopropanol puro (100%) foram adicionados. Após a homogeneização das soluções, transferiu-se o conteúdo para uma coluna de ligação de troca iônica pertencente ao *kit miRCURY™ RNA Isolation Kit – Biofluids* (#300112, *Exiqon, Vedbaek, Dinamarca*).

A coluna foi incubada por 2 min, em temperatura ambiente, e esvaziada por um dispositivo à vácuo multi-entrada. Após, 100 µL de solução de lavagem foram adicionadas à coluna. A solução de lavagem foi removida usando um dispositivo à vácuo e, novamente, acrescentada à coluna em um volume 700 µL. Removeu-se, novamente, a solução por este dispositivo. 250 µL de solução de lavagem foram adicionados e a coluna foi centrifugada a 11.000 g para secá-las totalmente. A coluna foi transferida para um novo tubo e 50 µL de água livre de RNase foram adicionados diretamente na sua membrana. Posteriormente, a coluna foi incubada por 1 min, em temperatura ambiente, previamente à centrifugação a 11.000 g. O RNA foi estocado em freezer a -80 °C.

5.15.2 Controle de qualidade das amostras

Para averiguar a qualidade das amostras dois testes foram aplicados anteriormente a coleta de dados: utilização de RNA *spike-in* e verificação de ocorrência de hemólise.

RNA *spike-in*

RNA *spike-in* são RNA transcritos não encontrados na amostra analisada utilizados para a calibração da (i) extração do RNA (UniSp2, UniSp4, UniSp5), (ii) controle da síntese de cDNA (UniSp6) e (iii) verificação do processo de amplificação por PCR inter-placas (UniSp3). Sua utilização permite constatar a presença de inibidores da síntese de cDNA e da reação em cadeia de polimerase em tempo real (rt PCR), bem como a presença de nucleases.

Para isso, cada RNA *spike-in* foi centrifugado e ressuspendido pela adição de 80 µL de água livre de nuclease. Após acondicionado o frasco por 20 min em gelo, homogeneizou-se a solução, e adicionou-se, antes de cada etapa correspondente de cada RNA *spike-in*, 1 µL da solução na amostra de plasma.

Hemólise

A degradação de eritrócitos é um dos maiores contaminantes de microRNA no plasma (ELDH et al., 2012). Sendo assim, no intuito de verificar a presença de hemólise nas amostras, foram analisados por PCR em tempo real dois microRNA: miR-451a (presente em hemácias) e o miR-23a-3p (estável no plasma e não afetado por hemólise). A diferença de expressão entre os miR-23a-3p e miR-451a correlaciona-se com o grau de hemólise. Diferenças acima de 7 indicam risco aumentado de contaminação das amostras por microRNA oriundos de eritrócitos.

5.15.3 Análise de 752 microRNA por real-time qPCR

19 µL de RNA foram reversamente transcritos em 95 µL de reações usando o *kit miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, Polyadenylation and cDNA synthesis* (Exiqon, Veadbaek, Dinamarca). cDNA foi diluído 50 vezes, sendo que 10 µL dessa solução foram utilizados para as reações de PCR, de acordo com o protocolo *miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR*. Cada microRNA foi quantificado uma vez pelo qPCR no *microRNA Ready-to-Use PCR, Human panel I+II* usando *ExiLENT SYBR® Green master mix*. Foram utilizadas duas placas, as quais continham 384 poços, sendo analisados, no total, 752 microRNA. A amplificação foi realizada em *LightCycler® 480 Real-Time PCR System* (Roche). As curvas de amplificação foram analisadas usando o *software Roche LC (Pleasanton, Estados Unidos)* para determinação de ambos quantificação de ciclos (Cq) por método derivativo secundário e análises de curva de *melting*.

5.15.4 Replicação de 13 microRNA

Dentre os 752 microRNA analisados, 13 microRNA foram selecionados a partir da significância estatística ($p < 0,05$) para a replicação das análises. Assim, 2 µL RNA de cada amostra foram reversamente transcritos em 10 µL de reações usando o *kit*

miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, Polyadenylation and cDNA synthesis (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca). cDNA foi diluído 50 x e analisado em 10 µL de reações de PCR de acordo com o protocolo *miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR*. Foram avaliados por qPCR, os 13 microRNA: miR-200b-3p, miR-200c-3p, miR-143-3p, miR-34a-3p, miR-205-5p, miR-375, miR-145-5p, miR-342-3p, miR-150-5p, miR-30a-5p, miR-10b-5p, miR-2110, miR-33b-5p. Para verificação de hemólise nas amostras, os microRNA miR-451a e miR-23a-3p foram dosados. Utilizou-se *ExiLENT SYBR® Green master mix* nas reações. Controles negativos foram analisados conforme as amostras. A amplificação ocorreu pelo sistema *LightCycler® 480 Real-Time PCR System* (Roche) em uma placa contendo 384 poços. As curvas de amplificação, determinação de Cq (pelo método derivativo secundário) e curvas de *melting* foram analisadas usando o *software Roche LC* (Pleasanton, Estados Unidos).

5.15.5 Análises dos dados

A eficiência da amplificação foi calculada usando algoritmos similares para o *LinReg software* (Amsterdã, Países Baixos). Todos ensaios foram inspecionados por distintas curvas de *melting* e a temperatura de *melting* (Tm) foi checada para estar entre as especificações conhecidas para o ensaio. Além disso, foram detectados os ensaios com 5 Cqs a menos do que o controle negativo, e com Cq<37 para ser incluído nas análises de dados. Os dados que não passaram pelo critério foram omitidos de quaisquer outras análises. O Cq foi calculado como derivativo secundário. A normalização foi realizada pela média dos ensaios detectados em todas as amostras (Cq da amostra - média Cq).

5.15.6 Análise de redes gênicas

Após obtermos o padrão de expressão de miRNA, analisou-se os mRNA alvo dos miRNA com $p > 0,05$ vs período basal em pelo menos 1 tempo. Utilizamos o *software DIANA miRPath v.3* que nos permitiu examinar interações microRNA-mRNA

demonstrados experimentalmente, priorizando alvos baseados no contexto biológico relevante (como, por exemplo, no nosso caso, dietas hiperlipídicas, inflamação e endotoxemia) e visualizar as interações moleculares entre estes miRNAs e seus mRNA alvo e o impacto biológico relacionado. Isso foi feito por meio de um processo de filtragem que utiliza os bancos de dados de alvos de miRNA: *TarBase* (alvos que foram determinados experimentalmente), onde podemos selecionar o contexto biológico e doença.

Para submetermos os dados no programa para análise, primeiramente calculamos os *fold-changes* (aumento ou redução da expressão dos miRNA em relação ao período basal) dos miRNA estudados. O cálculo do *fold-change* é a divisão das médias de cada tempo de coleta de sangue pós-ingestão da refeição hiperlipídica dos valores de $2^{-\Delta CT}$ pela média do período basal, sendo que quando esse valor era menor que 1, o dividiremos de -1 para saber o quanto o gene estava diminuído em relação à amostra no período basal. Para a análise de redes gênicas submetemos apenas dados de miRNA que tiveram expressão com significância estatística.

5.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados em média e desvio padrão. Inicialmente, os três tempos (1, 3 e 5 horas) foram avaliados em relação ao período basal por meio de ANOVA. Os resultados observados nos três tempos supramencionados, expressos em relação ao grupo basal, foram comparados ao final da intervenção por meio do teste t para variáveis independentes, ou o equivalente não-paramétrico. Foi adotado um valor de alfa $<0,05$ para rejeição da hipótese de nulidade.

As correlações foram realizadas por regressão linear simples, considerando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

Caracterização da amostra

Foram realizadas 26 entrevistas, estando 14 mulheres dentro dos critérios de inclusão. Destas, duas participantes desistiram de participar do estudo, e uma teve mal-estar durante a primeira coleta de sangue, totalizando uma amostra de 11 indivíduos. Todas as voluntárias eram eutróficas, normotensas, e apresentavam baixo risco cardiovascular segundo a classificação da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2014) com base na medida circunferência da cintura (CC). As características das participantes estão descritas na tabela 4.

Tabela 4 – Características das participantes no período basal do estudo

	Média (DP)
Idade (anos)	27,17 (4,65)
Peso (kg)	56,46 (5,95)
Estatura (m)	1,62 (0,05)
IMC (kg/m²)	21,50 (2,05)
CC (cm)	72,00 (5,17)
PAS (mmHg)	103,13 (9,52)
PAD (mmHg)	62,83 (8,30)

¹ Todos os valores são média e desvio padrão (DP) (n=11). IMC, Índice de massa corporal; CC, circunferência da cintura; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica.

Efeito da refeição-teste hiperlipídica nas concentrações plasmáticas de glicose, insulina e perfil lipídico

Não houve diferença significativa na glicemia em todos os tempos avaliados (Figura 7A). A refeição hiperlipídica elevou significativamente ($p < 0,05$ vs período basal) as concentrações séricas de insulina nos tempos 1 e 3 horas e reduziu no tempo 5 h quando comparada a sua concentração com a do tempo 1 h (Figura 7B).

Figura 7 - Média e desvio padrão das concentrações de glicose (A) e insulina (B) plasmáticas após a ingestão da refeição hiperlipídica. * $P < 0,05$ vs período basal. + $P < 0,05$ vs 1 h

Em relação ao perfil lipídico (Figura 8), apenas as concentrações plasmáticas de triacilgliceróis tiveram aumento significativo ($p < 0,05$) nos momentos 1, 3 e 5 horas após a ingestão da refeição-teste se comparadas com a do período basal, bem como verificou-se diferenças significativas entre as concentrações dos momentos 3 e 5 horas (Figura 8A).

Figura 8 – Média e desvio padrão do perfil lipídico após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica. * $P < 0,05$ vs período basal. + $P < 0,05$ vs 3 h.

Efeito da refeição-teste hiperlipídica nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e perfil de ácidos graxos

As concentrações de AGNE no plasma tiveram redução significativa ($p < 0,05$) após 1 e 3 horas da ingestão da refeição-teste hiperlipídica se comparadas com a do período basal, e também, diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações dos tempos 1 e 5 horas (Figura 9).

Figura 9 – Média e desvio padrão das concentrações de AGNE após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica. * $P < 0,05$ vs período basal. + $P < 0,05$ vs 1 h.

A refeição hiperlipídica alterou as concentrações de ácidos graxos saturados no plasma (Figura 10). O percentual do ácido mirístico (C14:0) no plasma elevou-se significativamente ($p < 0,05$) após 1, 3 e 5 horas após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica se comparado com do período basal. Além disso, o percentual deste ácido graxo diferiu de forma significativa ($p < 0,05$) entre os tempos 3 e 1 hora (Figura 10A). O percentual do ácido palmítico (C16:0) no plasma aumentou significativamente ($p < 0,05$) após 3 e 5 horas se comparado com do período basal e do tempo 1 hora (Figura 10B). Já o percentual do ácido esteárico (C18:0) teve elevação significativa ($p < 0,05$) no plasma apenas após 5 horas se comparado com os demais tempos (Figura 10C).

Figura 10 – Média e desvio padrão do percentual de ácidos graxos saturados no plasma após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica. * $P < 0,05$ vs período basal. + $P < 0,05$ vs 1 h. # $P < 0,05$ vs período basal, 1 h e 3 h.

Não houve alteração significativa no percentual de ácido graxo *trans* elaídico (C18:1 n-9 *trans*) após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica (Figura 11).

Figura 11 – Média e desvio padrão do percentual de ácido graxo *trans* no plasma após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica. * $P < 0,05$ vs período basal. + $P < 0,05$ vs 1 h. # $P < 0,05$ vs período basal, 1 h e 3 h.

Em relação aos percentuais de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados analisados no plasma - com exceção do ácido oleico (C18:1 n-9 *cis*), que teve seu percentual elevado significativamente ($p < 0,05$ vs período basal) após 3 horas - os demais ácidos graxos tiveram seu percentual reduzido após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica (Figura 12).

Figura 12 – Média e desvio padrão dos percentuais de ácidos graxos mono- e poli-insaturados no plasma após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica. * $P < 0,05$ vs período basal. + $P < 0,05$ vs 1 h.

Efeito da refeição-teste hiperlipídica nas concentrações plasmáticas de proteína C reativa e citocinas

Quando comparado todos os tempos, não houveram alterações significativas ($p < 0,05$) nas concentrações de proteína C reativa (Figura 13).

Figura 13 – Média e desvio padrão das concentrações de proteína C reativa (PCR) após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica.

Em relação às concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias, o TNF-alfa elevou-se significativamente após 5 horas da ingestão da refeição-teste hiperlipídica em comparação com as do período basal e de 1 hora (Figura 14A).

Figura 14 – Média e desvio padrão das concentrações plasmáticas das citocinas pró-inflamatórias – TNF- α (A), IL-6 (C), IL-18 (D), e IL-17a (E) e do TNFR (B) - após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica. * $P < 0,05$ vs período basal. + $P < 0,05$ vs 1 h.

Não houveram alterações significativas nas concentrações plasmáticas da citocina anti-inflamatória, IL-10, nos tempos avaliados (Figura 15).

Figura 15 – Média e desvio padrão das concentrações plasmáticas da citocina anti-inflamatória, IL-10, após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica.

A molécula de adesão sVCAM-1 teve sua concentração plasmática elevada de forma significativa após 5 horas da ingestão da refeição-teste hiperlipídica se comparada com a do período basal (Figura 16A). Não houveram alterações significativas nas concentrações plasmáticas de sICAM-1 e da quimiocina, MCP-1, nos tempos avaliados (Figura 16B e 16C).

Figura 16 – Média e desvio padrão das concentrações plasmáticas das moléculas de adesão – sVCAM-1 (A), sICAM-1 (B) - e da quimiocina – MCP-1 (C) após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica. * $P < 0,05$ vs período basal.

Efeito da refeição-teste hiperlipídica nas concentrações plasmáticas de LPS

A ingestão da refeição-teste hiperlipídica promoveu aumento significativo das concentrações plasmáticas de LPS nos tempos 1, 3 e 5 horas em comparação com a do período basal (Figura 17).

Figura 17 – Média e desvio padrão das concentrações de lipopolissacarídeos (LPS) plasmáticos após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica. * $P < 0,05$ vs basal.

Correlação entre as concentrações de sVCAM-1 e TG

Observa-se uma correlação positiva entre as concentrações de sVCAM-1 e TG 5 horas após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica (Figura 18).

Figura 18 – Correlação entre as concentrações de sVCAM-1 e TG após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica.

Análise da eficiência da extração, transcrição reversa, e qPCR dos 752 MicroRNA

O nível constante dos ensaios mostrados no gráfico abaixo indica que a extração do RNA, transcrição reversa e qPCR foram bem-sucedidos, não havendo contaminação das amostras por inibidores (Figura 19).

Figura 19 – Cqs brutos obtidos para o controle dos ensaios por RNA *slope-in*.

Em relação à ocorrência de hemólise nas amostras, apenas duas tiveram diferenças ligeiramente superiores a 7, indicando possível contaminação de microRNA oriundos de eritrócitos (Figura 20).

Figura 20 – Diferenças dCq das amostras analisadas para verificação de hemólise.

Efeito da refeição-teste hiperlipídica na expressão dos 752 microRNA no plasma

Dos 752 microRNA analisados em cada amostra, foram detectados em média 264 microRNA por amostra, onde 136 eram comuns em todas as amostras (Tabela 5).

Tabela 5 – Número de miRNA analisados e detectados nas amostras

	Nº miRNA detectados
<i>miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR Human panel I-II</i>	752
miRNA detectados em todas amostras	136
Média de miRNA detectados por amostra	264

O *heat map* supervisionado (Figura 21) mostra que não houve nenhum padrão de expressão de microRNA se agrupadas as amostras de acordo com o momento de coleta (1, 3 e 5 horas vs período basal).

Figura 21 - Diagrama de *heat map* com agrupamento hierárquico supervisionado dos miRNA com p -valor $< 0,05$ vs período basal.

A partir das análises estatísticas, 45 microRNA tiveram $p < 0,05$ quando comparadas suas expressões entre os tempos 1, 3 e 5 horas. Destes, 33 alteraram, de forma significativa, nos tempos 1, 3 e 5 horas vs o período basal. Seguem abaixo os valores de p e *fold-changes* vs período basal destes microRNA, separando-os por tempo após a ingestão da refeição-teste (Tabela 6).

Tabela 6 – *Fold-change* dos microRNA significativos ($p < 0,05$) de acordo com o tempo após a ingestão da refeição-teste.

	MicroRNA detectados	1 hora	3 horas	5 horas			
		vs.	vs.	vs.	3 horas	5 horas	5 horas
		Período basal	Período basal	Período basal	vs. 1 hora	vs. 1 hora	vs. 3 horas
1	hsa-miR-10b-5p	-1,72 $p=0,003$	-1,26 $p>0,05$	-1,63 $p>0,05$	1,36 $p>0,05$	1,06 $p>0,05$	-1,29 $p>0,05$
2	hsa-miR-1260a	-1,77 $p=0,003$	-1,32 $p>0,05$	-1,84 $p=0,007$	1,37 $p>0,05$	-1,04 $p>0,05$	-1,41 $p>0,05$
3	hsa-miR-200b-3p	1,82 $p=0,006$	1,72 $p=0,039$	1,64 $p>0,05$	-1,06 $p>0,05$	-1,11 $p>0,05$	-1,05 $p>0,05$
4	hsa-miR-200c-3p	1,82 $p=0,009$	1,39 $p>0,05$	1,87 $p=0,021$	-1,31 $p>0,05$	1,02 $p>0,05$	1,35 $p>0,05$
5	hsa-miR-143-3p	1,71 $p=0,010$	1,81 $p=0,002$	1,39 $p>0,05$	1,06 $p>0,05$	-1,22 $p>0,05$	-1,30 $p>0,05$
6	hsa-miR-342-3p	-1,46 $p=0,012$	-1,22 $p>0,05$	-1,14 $p>0,05$	1,19 $p>0,05$	1,27 $p>0,05$	1,07 $p>0,05$
7	hsa-miR-150-5p	-1,47 $p=0,018$	-1,39 $p>0,05$	-1,10 $p>0,05$	1,06 $p>0,05$	1,34 $p>0,05$	1,27 $p>0,05$
8	hsa-miR-145-5p	1,59 $p=0,023$	1,62 $p=0,007$	1,53 $p=0,009$	1,02 $p>0,05$	-1,04 $p>0,05$	-1,06 $p>0,05$
9	hsa-miR-92b-3p	-1,70 $p=0,027$	-1,07 $p>0,05$	-2,37 $p=0,003$	1,75 $p>0,05$	-1,38 $p>0,05$	-2,11 $p=0,014$
10	hsa-miR-2110	1,88 $p=0,029$	1,18 $p>0,05$	1,50 $p>0,05$	-1,59 $p>0,05$	-1,25 $p>0,05$	1,27 $p>0,05$
11	hsa-miR-33b-5p	1,60 $p=0,030$	1,16 $p>0,05$	1,18 $p>0,05$	-1,38 $p>0,05$	-1,35 $p>0,05$	1,02 $p>0,05$
12	hsa-miR-195-5p	1,93 $p=0,031$	1,00 $p>0,05$	1,94 $p>0,05$	-1,62 $p>0,05$	1,04 $p>0,05$	1,74 $p>0,05$
13	hsa-miR-548c-5p	-1,48 $p=0,032$	-1,06 $p>0,05$	-1,28 $p>0,05$	1,40 $p>0,05$	1,16 $p>0,05$	-1,21 $p>0,05$
14	hsa-miR-34a-3p	-1,79 $p=0,038$	-1,67 $p>0,05$	-1,42 $p>0,05$	1,07 $p>0,05$	1,26 $p>0,05$	1,17 $p>0,05$

continua

Tabela 6 – *Fold-change* dos microRNA significativos ($p < 0,05$) de acordo com o tempo após a ingestão da refeição-teste.

continuação

MicroRNA detectados		1 hora	3 horas	5 horas			
		vs.	vs.	vs.	3 horas	5 horas	5 horas
		Período	Período	Período	vs.	vs.	vs.
		basal	basal	basal	1 hora	1 hora	3 horas
15	hsa-miR-29a-5p	-1,48 $p=0,040$	-1,15 $p>0,05$	-1,37 $p>0,05$	1,07 $p>0,05$	-1,04 $p>0,05$	-1,27 $p>0,05$
16	hsa-miR-181c-5p	-1,53 $p=0,043$	1,04 $p>0,05$	-1,14 $p>0,05$	1,26 $p>0,05$	1,50 $p>0,05$	-1,49 $p>0,05$
17	hsa-miR-143-5p	2,41 $p=0,047$	1,82 $p>0,05$	1,96 $p=0,043$	-1,09 $p>0,05$	1,13 $p>0,05$	-1,16 $p>0,05$
18	hsa-miR-136-3p	-1,56 $p=0,049$	1,24 $p>0,05$	1,72 $p=0,023$	2,25 $p=0,006$	2,40 $p=0,012$	1,26 $p>0,05$
19	hsa-miR-205-5p	-1,28 $p>0,05$	-2,13 $p=0,002$	-2,08 $p=0,001$	2,25 $p=0,006$	-1,66 $p>0,05$	1,02 $p>0,05$
20	hsa-miR-375	1,39 $p>0,05$	1,80 $p=0,008$	1,72 $p=0,009$	1,29 $p>0,05$	1,24 $p>0,05$	-1,05 $p>0,05$
21	hsa-miR-379-5p	1,29 $p>0,05$	2,28 $p=0,009$	1,07 $p>0,05$	2,02 $p=0,026$	-1,34 $p>0,05$	-2,29 $p=0,016$
22	hsa-miR-191-5p	1,22 $p>0,05$	1,33 $p=0,021$	1,16 $p>0,05$	1,09 $p>0,05$	-1,05 $p>0,05$	-1,14 $p>0,05$
23	hsa-miR-410-3p	1,44 $p>0,05$	2,40 $p=0,028$	1,38 $p>0,05$	1,51 $p>0,05$	1,12 $p>0,05$	-1,41 $p>0,05$
24	hsa-miR-16-1-3p	-1,13 $p>0,05$	-1,72 $p=0,029$	1,06 $p>0,05$	-1,29 $p>0,05$	1,31 $p>0,05$	1,88 $p>0,05$
25	hsa-miR-376b-3p	1,38 $p>0,05$	2,11 $p=0,041$	1,11 $p>0,05$	1,53 $p=0,035$	-1,02 $p>0,05$	-1,48 $p>0,05$
26	hsa-miR-29a-3p	-1,31 $p>0,05$	-1,32 $p=0,043$	-1,20 $p>0,05$	-1,01 $p>0,05$	1,09 $p>0,05$	1,10 $p>0,05$
27	hsa-miR-505-3p	-1,20 $p>0,05$	-1,31 $p=0,047$	-1,08 $p>0,05$	-1,09 $p>0,05$	1,12 $p>0,05$	1,22 $p>0,05$

Continua

Tabela 6 – *Fold-change* dos microRNA significativos ($p < 0,05$) de acordo com o tempo após a ingestão da refeição-teste.

continuação

MicroRNA detectados	1 hora	3 horas	5 horas			
	vs.	vs.	vs.	3 horas	5 horas	5 horas
	Período basal	Período basal	Período basal	vs. 1 hora	vs. 1 hora	vs. 3 horas
28 hsa-miR-95-3p	1,14 $p > 0,05$	1,62 $p > 0,05$	1,89 $p = 0,012$	1,50 $p > 0,05$	1,24 $p > 0,05$	-1,07 $p > 0,05$
29 hsa-miR-18a-5p	1,21 $p > 0,05$	1,27 $p > 0,05$	1,33 $p = 0,029$	1,04 $p > 0,05$	1,10 $p > 0,05$	1,05 $p > 0,05$
30 hsa-miR-545-3p	1,03 $p > 0,05$	-1,02 $p > 0,05$	-2,70 $p = 0,038$	-1,13 $p > 0,05$	-1,41 $p > 0,05$	-2,07 $p = 0,025$
31 hsa-miR-885-5p	-1,37 $p > 0,05$	-1,76 $p > 0,05$	-1,74 $p = 0,041$	-1,25 $p > 0,05$	-1,39 $p > 0,05$	-1,17 $p > 0,05$
32 hsa-miR-486-3p	1,36 $p > 0,05$	-1,02 $p > 0,05$	1,49 $p = 0,042$	-1,39 $p > 0,05$	1,09 $p > 0,05$	1,52 $p > 0,05$
33 hsa-miR-454-3p	1,05 $p > 0,05$	-1,21 $p > 0,05$	-1,42 $p = 0,042$	-1,27 $p > 0,05$	-1,49 $p > 0,05$	-1,17 $p > 0,05$

Como observado no diagrama de *Venn*, apenas o miR-145-5p teve sua expressão no plasma aumentada significativamente em todos os tempos, e 10 microRNA foram detectados em pelo menos dois tempos (Figura 22). Dentre eles, os miR-1260a, miR-92b-3p, miR-136-3p e miR-205-5p foram os únicos a apresentarem expressão reduzida após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica. Os seis microRNA restantes aumentaram a sua expressão, de forma significativa, em comparação ao período basal, e o miR-136-3p foi o único que teve sua expressão reduzida significativamente após 1 hora e, posteriormente, aumentada após 5 horas da ingestão se comparada ao período basal.

Figura 22- Diagrama de *Venn*. Número de microRNA detectados nos tempos 1, 3, 5 vs período basal ($p < 0,05$).

Efeito da refeição hiperlipídica na expressão dos 13 microRNA no plasma

Dos 752 microRNA, 13 miRNA, com valor de $p < 0,05$ vs período basal em mais de um tempo, tiveram suas expressões novamente analisadas. Dentre eles, 9 microRNA alteraram de forma significativa quando comparados ao período basal: hsa-miR-150-5p, -145-5p, -143-3p, -205-5p, -200b-3p, -200c-3p, -342-3p, -10b-5p e -375 (Tabela 7).

Tabela 7 – *Fold-change* dos microRNA significativos ($p < 0,05$) de acordo com o tempo após a ingestão da refeição-teste.

MicroRNA detectados		3 horas			5 horas		
		1 hora	vs.	vs.	3 horas	5 horas	5 horas
		vs. Período	Período	Período	vs.	vs.	vs.
		basal	basal	basal	1 hora	1 hora	3 horas
1	hsa-miR-150-5p	-1,52 $p=0,002$	-1,58 $p=0,001$	-1,26 $p=0,018$	-1,04 $p>0,05$	1,20 $p>0,05$	1,25 $p=0,046$
2	hsa-miR-145-5p	1,65 $p=0,002$	1,61 $p=0,011$	1,49 $p=0,004$	-1,03 $p>0,05$	-1,11 $p>0,05$	-1,08 $p>0,05$
3	hsa-miR-143-3p	1,71 $p=0,004$	1,68 $p=0,003$	1,47 $p=0,019$	-1,02 $p>0,05$	-1,16 $p>0,05$	-1,14 $p>0,05$
4	hsa-miR-205-5p	-1,59 $p=0,005$	-1,76 $p=0,015$	-1,96 $p=0,001$	-1,03 $p>0,05$	-1,22 $p>0,05$	-1,05 $p>0,05$
5	hsa-miR-200b-3p	1,69 $p=0,013$	1,98 $p=0,023$	1,35 $p>0,05$	1,17 $p>0,05$	-1,26 $p>0,05$	-1,47 $p=0,036$
6	hsa-miR-200c-3p	1,82 $p=0,027$	1,53 $p>0,05$	1,21 $p>0,05$	-1,44 $p>0,05$	-1,57 $p>0,05$	-1,09 $p>0,05$
7	hsa-miR-342-3p	-1,31 $p=0,028$	-1,19 $p>0,05$	-1,11 $p>0,05$	1,10 $p>0,05$	1,18 $p>0,05$	1,07 $p>0,05$
8	hsa-miR-10b-5p	-1,30 $p>0,05$	-1,50 $p=0,002$	-1,51 $p=0,010$	-1,15 $p>0,05$	-1,16 $p>0,05$	-1,01 $p>0,05$
9	hsa-miR-375	1,19 $p>0,05$	1,68 $p=0,014$	1,48 $p=0,039$	1,42 $p=0,038$	1,25 $p>0,05$	-1,13 $p>0,05$

Análise das redes gênicas

A partir dos resultados gerados pelo *software online mirPath* versão 3 e da análise da literatura, obteve-se as seguintes redes relacionadas à cascata de sinalização inflamatória (Figura 23, 24, 25):

Figura 23 – Alvos dos miRNA significativos ($p < 0,05$ vs período basal) detectados relacionados com a via inflamatória após 1 hora da ingestão da refeição-teste hiperlipídica por mulheres saudáveis, segundo *mirPath* versão 3. Legenda: caixas vermelhas – alvos possivelmente reduzidos; caixas verdes - alvos não modulados pelos miRNA; caixas amarelas – alvos que podem ou não estar sendo modulados; miRNA grifados em vermelho – expressão aumentada; miRNA grifados em verde – expressão reduzida; seta com linha dupla – estímulo indireto do miRNA sobre o alvo.

Figura 24 – Alvos dos miRNA significativos ($p < 0,05$ vs período basal) detectados relacionados com a via inflamatória após 3 horas da ingestão da refeição-teste hiperlipídica por mulheres saudáveis, segundo *mirPath* versão 3. Legenda: caixas vermelhas – alvos possivelmente reduzidos; caixas verdes - alvos não modulados pelos miRNA; caixas amarelas – alvos que podem ou não estar sendo modulados; miRNA grifados em vermelho – expressão aumentada; miRNA grifados em verde – expressão reduzida; seta com linha dupla – estímulo indireto do miRNA sobre o alvo.

Figura 25 – Alvos dos miRNA significativos ($p < 0,05$ vs período basal) detectados relacionados com a via inflamatória após 5 horas da ingestão da refeição-teste hiperlipídica por mulheres saudáveis, segundo *mirPath* versão 3. Legenda: caixas vermelhas – alvos possivelmente reduzidos; caixas verdes - alvos não modulados pelos miRNA; caixas amarelas – alvos que podem ou não estar sendo modulados; miRNA grifados em vermelho – expressão aumentada; miRNA grifados em verde – expressão reduzida; seta com linha dupla – estímulo indireto do miRNA sobre o alvo.

7. DISCUSSÃO

O estudo dos efeitos pós-prandiais de uma refeição ou alimento é muito importante pois reflete a resposta aguda metabólica após a sua ingestão, contribuindo para melhor escolha dos alimentos, uma vez que o ser humano passa a maior parte do tempo no estado pós-prandial (LAIRON et al., 2007). O dismetabolismo pós-prandial, como proposto por O'KEEFE e BELL (2007), é a “elevação exarcebada transiente da glicemia, ácidos graxos e triacilgliceróis após refeições hipercalóricas ricas em carboidratos e ácidos graxos saturados” e está associado ao maior risco cardiovascular.

Diretrizes apontam a análise do perfil lipídico plasmático como um dos pontos importantes para determinação do risco cardiovascular (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017). Um estudo de coorte relacionado a esse fato é o *Women's health study*, o qual verificou correlação positiva entre a concentração plasmática de triacilgliceróis e eventos cardiovasculares em 6.391 mulheres americanas (BANSAL et al., 2007). Entretanto, discute-se hoje se os parâmetros lipídicos pós-prandiais teriam relevância em se tratando de risco para desenvolvimento de DCV, principalmente, no que concerne à hipertrigliceridemia pós-prandial (CULLEN, 2000; CASTELLI, 1986).

Nosso estudo mostrou que uma refeição contendo mais de 50% do valor calórico total em lipídios promove aumento da concentração plasmática de triacilgliceróis após 1, 3 e 5 horas da sua ingestão em relação aos valores observados no período basal. De acordo com BORÉN et al. (2014), valores de triacilgliceróis plasmáticos no período pós-prandial abaixo de 180 mg/dL são considerados desejáveis. Já a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2017) considera valores inferiores a 175 mg/dL como desejáveis para análise de TG sem jejum. A média encontrada em nosso estudo no tempo 3 horas — maior concentração plasmática observada — foi de 121 mg/dL (BORÉN et al., 2014). NAPPO et al. (2002) obtiveram os mesmos resultados após 4 horas da ingestão de uma

refeição hiperlipídica (59,2% do valor calórico total na forma de lipídios), em 20 indivíduos saudáveis. Além disso, os autores encontraram correlação positiva entre as concentrações plasmáticas de triacilgliceróis e sVCAM-1. Em nosso estudo, esta correlação também foi verificada no tempo de 5 horas pós-ingestão.

sVCAM-1 é responsável pelo rolamento e adesão de leucócitos na parede vascular, e é induzida rapidamente em condições pró-ateroscleróticas, sendo assim, um importante iniciador deste processo (CYBULSKY et al., 2001 e LEY et al., 2001). Segundo o *miRSearch v.3*, o gene *VCAM1* pode ser modulado por alguns microRNA, mas apenas dois, miR-126 e -200a-3p, foram experimentalmente validados. Apesar de nenhum destes microRNA terem sido detectados em nossas análises, no que se refere a via inflamatória, esta molécula de adesão tem a sua síntese estimulada pela ativação de fatores de transcrição — NF- κ B e AP-1 —, pelo TNF-alfa, IL-1 β , ROS e pelo *shear stress*, podendo, assim, ter sua concentração elevada devido a algum destes outros fatores (COOK-MILLS et al., 2011).

Além dos triacilgliceróis plasmáticos, os ácidos graxos não esterificados têm sido associados com a patogênese da aterosclerose e doenças cardiovasculares, bem como, o desenvolvimento do diabetes tipo 2 (GHOSH et al., 2017). No presente estudo, verificamos redução da concentração plasmática de AGNE após 1 e 3 horas da ingestão da refeição-teste hiperlipídica, o que pode ser explicado pelos valores elevados de insulina apresentados em ambos os tempos. A insulina, produzida após estímulo da ingestão alimentar, é responsável pela inibição da lipólise via fosforilação e ativação da enzima fosfodiesterase (PDE) 3B a qual catalisa a produção de AMP a partir do AMPc, reduzindo a liberação de AGNE a partir do tecido adiposo branco e, consequentemente, sua concentração no plasma (DIPILATO et al., 2015). De acordo com o estudo realizado por LORENTE-CEBRIAN et al. (2014), em adipócitos humanos diferenciados, a PDE3B é reduzida na presença do miR-145-5p, tendo assim, o papel de ativação da lipólise. Nosso estudo, verificou elevação da expressão deste microRNA no plasma, em todos os tempos após a ingestão da refeição rica em lipídios. Não

obstante, existem divergências quanto ao papel deste microRNA no processo de lipólise e, desse modo, não podemos aferir nenhum potencial mecanismo deste microRNA na redução do AGNE (LIN et al., 2014).

No presente estudo, devido à composição da refeição-teste ser, predominantemente, de AGS (mais de 80% do valor calórico total de lipídios), o percentual deste tipo de ácido graxo elevou-se no plasma no período pós-prandial. Já os percentuais de ácidos graxos insaturados reduziram, com exceção do ácido oleico (C18:1 n-9 cis), que teve o seu percentual elevado. Cabe destacar que o C18:1 n-9 cis é o ácido graxo mais abundante do plasma (MIWA, 2002).

Muitos estudos apontam o potencial pró-inflamatório dos AGS, relacionando-os com doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2. Conforme discutido anteriormente, os AGS podem ativar a via TLR-4/NF- κ B, elevando a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α . O TNF- α foi a única citocina a qual apresentou alteração significativa quando comparado ao período basal, tendo sua concentração aumentada após 5 horas da ingestão da refeição-teste. Estudos indicam que os microRNA podem participar na regulação da expressão desta citocina, seja de forma direta, como miR-181c-5p, ou indireta, como o miR-145-5p. No caso do miR-181c-5p, ZHANG et al. (2012) verificaram inibição do TNF- α por este miRNA em células microgliais de ratos, concluindo que esta citocina é alvo direto do miR-181c-5p. Em nosso estudo, a expressão deste microRNA estava reduzida 1 hora após a ingestão da refeição-teste. Já LORENTE-CEBRIAN et al. (2014) mostraram aumento da síntese e secreção de TNF- α induzido pelo miR-145-5p, o qual, segundo os autores, estaria ativando a unidade p65 do NF- κ B, e consequentemente, ativando genes pró-inflamatórios.

O TNF- α , por sua vez, também pode ativar esta via por meio da ligação aos seus receptores, TNFR1 e 2, estando o primeiro presente em todos os tipos celulares.

FU et al. (2016) demonstraram ação inibitória do miR-29a sobre o TNFR1 em células pancreáticas de ratos. Este miRNA reduziu de forma significativa no tempo 3 horas.

Após a ligação entre TNF-alfa e seu receptor (TNFR1), há o recrutamento do domínio da morte associado ao TNFR (TRADD) e da quinase de interação com receptor-1 (Rip1), as quais formam um complexo com a ligação do fator 2 e 5 associados ao TNFR (TRAF2/5), para então, ativarem as proteínas-chaves, TAK1 e TAB1/2, relacionadas à ativação do NF-kB (MAHONEY et al., 2008). De acordo com o resultado do *software mirPath* v.3, dentre os microRNA analisados, quatro miRNA podem modular a expressão da TRAF5: no tempo 1 hora, miR-195-5p (FC = 1,93); 3 horas, -29a-3p (FC = -1,32), -191-5p (FC = 1,33); e 5 horas, -18a-5p (FC = 1,33) (VLACHOS et al., 2015).

MAHONEY et al. (2008) demonstraram a importância do papel do inibidor celular de apoptose 1 e 2 (cIAP1/2) na resposta do NF-kB e na regulação do processo de apoptose celular após estímulo do TNF-alfa. Segundo os autores, cIAP1/2 permite uma transdução de sinal adequada entre o TNFR1 e o complexo Rip1/TRADD/TRAF2/5 pois auxilia na poliubiquitinação da Rip1 pela TRAF2. Nossos resultados mostram possível inibição desta proteína por miRNA, principalmente, no tempo 1 hora, o qual apresentou maior número de microRNA significativos (vs período basal, $p < 0,05$) cujo alvo é a cIAP1/2, sendo eles: -145-5p (FC = 1,59), -200b-3p (FC = 1,82) e -200c-3p (FC = 1,82).

Ainda na via inflamatória mediada por NF-kB e AP-1, outro ligante importante para sua ativação é o LPS. O intestino humano contém um reservatório 1 g de LPS e em indivíduos saudáveis, esta endotoxina se encontra no plasma em baixas concentrações (1 a 200 pg/mL) (BERG, 1996). A variação do LPS plasmático pode ser ocasionada por inúmeros fatores, como, por exemplo, disbiose intestinal, tabagismo e dieta. A ingestão de uma refeição hiperlipídica pode contribuir para a translocação do LPS para o sangue pelo aumento da permeabilidade intestinal e da produção de quilomicrons (meio de

transporte do LPS, e principalmente, por contribuir mecanicamente para o distanciamento entre as paredes dos enterócitos) (MOREIRA et al., 2012).

Nossa refeição-teste hiperlipídica foi responsável pelo aumento significativo das concentrações plasmáticas de LPS (53% maior quando comparados os tempos 1 h vs período basal) 1, 3 e 5 horas pós-ingestão. GHANIN et al. (2009) obtiveram resultado similar ao nosso estudo, verificando um quadro de endotoxemia metabólica pós-prandial. Esses autores encontraram uma concentração de LPS 47% maior após 3 horas da ingestão de uma refeição contendo 51 g de lipídios em comparação aos valores de período basal em 10 indivíduos saudáveis.

Além disso, ERRIDGE et al. (2007) verificaram, após estudo *in vitro*, que monócitos humanos respondem mesmo a baixas (10 pg/mL) ou variações transientes (30 segundos) da concentração de LPS, resultando no aumento da concentração de TNF- α . Concluindo assim, que a endotoxemia de baixo grau pode contribuir para um estado pós-prandial inflamatório.

Como discutido anteriormente, os microRNA estão envolvidos na regulação pós-transcricional da inflamação e alguns deles relacionam-se com as concentrações de LPS. Neste sentido, os resultados de nosso estudo convergiram com os apresentados por SCHMIDT et al. (2009), o qual identificaram redução da expressão dos miR-342 e miR-150, e aumento do miR-143 após tratamento de uma cultura de células contendo leucócitos humanos com LPS. No caso do miR-342, o efeito da nossa refeição hiperlipídica diferiu do apresentado por CHARTOUMPEKIS et al. (2012), tendo como possíveis justificativas a utilização de um modelo experimental diferente em relação ao nosso, como o uso de camundongos e a análise do tecido adiposo, no qual este microRNA participa do processo de adipogênese.

Sabendo que esta endotoxina, assim como os AGNE, está envolvida na ativação da via de sinalização do NF- κ B, na via MyD88-dependente, o aumento dos miR-200c-

3p (FC(1h) = 1,82 e FC(5h) = 1,87) e 200b-3p (FC(1h) = 1,82 e FC(3h) = 1,72) após aumento da ingestão de lipídios poderia sinalizar uma possível ativação desta via e um possível mecanismo de *feedback* negativo, visto que suas expressões são estimuladas pelo fator de transcrição NF-kB e a proteína MyD88 é uma candidata a alvo destes microRNA (WENDLANDT et al., 2012). O miR-150-5p, também, está envolvido na inibição desta proteína, entretanto, sua expressão está reduzida 1 hora pós-ingestão da refeição-teste (FC(1h) = -1,47) (GHORPADE et al., 2013).

Na via não canônica do NF-kB (via MyD88-não dependente), o único microRNA, segundo o *mirPath* v.3, encontrado em nossas análises que poderia ter efeito inibitório de uma das proteínas que fazem parte desta via, a TRIF, foi o miR-29a-5p (FC(1h) = -1,48) o qual teve sua expressão reduzida 1 hora após a ingestão da refeição-teste (VLACHOS et al., 2015). Segundo VERSTAK et al. (2009), o MyD88 e o TRIF dependem das proteínas adaptadoras TIRAP e TRAM, respectivamente, para responderem a sinalização do TLR-4 e -2. A partir da análise de expressão do TIRAP em células progenitoras hematopoiéticas de camundongos, STARCZYNOWSKI et al. (2010) verificaram a ação inibitória do miR-145-5p sobre esta proteína, concluindo ser o TIRAP alvo do miR-145-5p.

Segue abaixo o quadro 2 o qual lista os miRNA significativos ($p < 0,05$ vs período basal) encontrados em nossas análises os quais regulam este complexo.

Quadro 2 – Regulação de proteínas-chave na ativação NF- κ B por microRNA significativos ($p < 0,05$ vs período basal) após a ingestão da refeição-teste hiperlipídica por mulheres saudáveis segundo o software online *mirPath* versão 3.

Alvo	microRNA	Fold-change (tempo pós-ingestão)
TAK1	hsa-miR-92b-3p	-1,70 (1 h) e -2,37 (5 h)
	hsa-miR-29a-5p	-1,48 (1h)
	hsa-miR-545-3p	-2,70 (5 h)
	hsa-miR-33b-5p	1,60 (1 h)
	hsa-miR-10b-5p	-1,72 (1 h)
TAB2	hsa-miR-29a-5p	-1,48 (1 h)
	hsa-miR-92-3p	-1,70 (1 h)
	hsa-miR-143-3p	1,71 (1 h) e 1,81 (3 h)
	hsa-miR-195-5p	1,93 (1 h)
TAB3	hsa-miR-195-5p	1,93 (1 h)

A cascata intracelular da inflamação promovida TNF- α , LPS e AGS culminam na ativação de um complexo de proteínas-chave para desencadeamento da translocação do NF- κ B para o núcleo. Fazem parte deste complexo a TAK1, e suas proteínas adaptadoras TAB 1, 2 e 3. O complexo TAK1-TAB1/2/3, então, ativa vias distintas que resultam na ativação de dois fatores de transcrição, AP-1 e NF- κ B, que translocam-se do citoplasma para o núcleo ativando genes envolvidos no processo inflamatório. Como podemos observar na figura 23, 24 e 25, inúmeros microRNA estão envolvidos na regulação desta via.

Além disso, como já citado anteriormente, o único microRNA com alteração significativa em todos os tempos foi o miR-145-5p que apresenta, também, vários alvos no que diz respeito a via de sinalização inflamatória (Figura 26).

Figura 26 – Alvos do miR-145-5p referentes a via pró-inflamatória NF-kB e AP-1 segundo o *mirPath* versão 3.

Assim, a análise de 752 microRNA no plasma de mulheres saudáveis foi importante para mostrar que mesmo resultando na alteração estatisticamente significativa de apenas 4% do total de miRNA analisados, verificamos que, a partir da análise das redes gênicas, estes microRNA desempenham papéis importantes no processo inflamatório, modulando diversos genes envolvidos na ativação do NF-kB e AP-1. Uma característica dos microRNA que contribui para explicação deste fato, é que um único microRNA possui diferentes alvos, e um mesmo alvo pode ser modulado por diferentes microRNA. Isso, também, dificulta a análise dos resultados gerados pela rede gênica, que passa apresentar tanto microRNA reduzidos ou aumentados após o estímulo externo perante ao mesmo gene, deixando a dúvida se existe uma possível sinergia ou antagonismo entre os microRNA.

Além disso, nosso estudo avaliou microRNA no plasma humano. E estudos mostram que os miRNA circulantes teriam papel importante na sinalização entre tecidos, como demonstrado por ZHOU et al. (2017). Cabe ainda destacar que este estudo é pioneiro na investigação da modulação pós-prandial de microRNA após a

ingestão de uma refeição hiperlipídica por mulheres saudáveis. Estudos mostram a ação de nutrientes na expressão de miRNA, mas nenhum mostrou que esta alteração pode ocorrer em um tempo reduzido após a ingestão alimentar, mostrando a importância da escolha alimentar em cada refeição.

Muitos estudos ainda são necessários para determinar os efeitos dos microRNA sobre a fisiologia humana, bem como as consequências da alimentação sobre a sua expressão. Nosso estudo mostrou uma possível relação entre ingestão de ácidos graxos, endotoxemia, inflamação e microRNA.

8. CONCLUSÃO

Uma refeição hiperlipídica, com elevado teor de ácidos graxos saturados, ocasiona um quadro de endotoxemia metabólica e altera a expressão de microRNA plasmáticos envolvidos na regulação do processo inflamatório no período pós-prandial.

9. REFERÊNCIAS

- Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013;14:475-488.
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 22;108(12):5003-8.
- [AOAC] - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official Methods of Analysis*. 16. ed. Arlington, 1995.
- Banerjee et al. microRNA let-7c regulates macrophage polarization. *J Immunol*. 2013 June 15;190(12):6542–6549.
- Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with non fasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA*. 2007;298:309-316.
- Benn M, Watts GF, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Familial hypercholesterolemia in the danish general population: prevalence, coronary artery disease, and cholesterol-lowering medication. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Nov;97(11):3956-64.
- Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol*. 1996;4:430-435.
- Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3:169-176.
- Beutler B. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*. 2004;40:845-859.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1959;37(8):911-7.
- Boon RA, Vickers KC. Intercellular transport of microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Feb;33(2):186-92.
- Borén J, Malikainen N, Adiels M, Taskinen MR. Postprandial hypertriglyceridemia as a coronary risk factor. *Clinica chimica Acta*. 2014;431:131-142.

Boutagy NE, McMillan RP, Frisard MI, Hulver MW. Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? *Biochimie*. 2016 May;124:11-20.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira. 2014.

Bruno IG et al. Identification of a microRNA that activates gene expression by repressing nonsense-mediated RNA decay. *Mol Cell*. 2011;42:500-510.

Byrd AE, Brewer JW. Micro(RNA)managing endoplasmic reticulum stress. *IUBMB Life*. 2013 May;65(5):373-81.

Caamano J, Hunter CA. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002;15:414-429.

Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, Gibson GR, Delzenne NM. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*. 2007 Nov;50(11):2374-83.

Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4):642–655.

Chartoumpekis DV, Zaravinos A, Ziros PG, Iskrenova RP, Psyrogiannis AI, Kyriazopoulou VE, Habeos IG. Differential expression of microRNAs in adipose tissue after long-term high-fat diet-induced obesity in mice. *PLoS One*. 2012;7(4):e34872.

Chen L, Hou J, Ye L, Chen Y, Cui J, Tian W, Li C, Liu L. MicroRNA-143 regulates adipogenesis by modulating the MAP2K5-ERK5 signaling. *Sci Rep*. 2014 Jan 22; 4:3819.

Clemente-Postigo M, Queipo-Ortuño MI, Murri M, Boto-Ordoñez M, Perez-Martinez P, Andres-Lacueva C, Cardona F, Tinahones FJ. Endotoxin increase after fat overload is related to postprandial hypertriglyceridemia in morbidly obese patients. *J Lipid Res*. 2012;53(5):973-8.

Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Sep 15;15(6):1607-38.

Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, O'Keefe JH, Brand-Miller J. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:341–54.

Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001 May;107(10):1255-62.

Daimiel-Ruiz L, Klett-Mingo M, Konstantinidou V, Micó V, Aranda JF, García B, Martínez-Botas J, Dávalos A, Fernández-Hernando C, Ordovás JM. Dietary lipids modulate the expression of miR-107, an miRNA that regulates the circadian system. *Mol Nutr Food Res*. 2015 Mar;59(3):552-65.

Derosa G, Ferrari I, D'Angelo A, Salvadeo SA, Fogari E, Gravina A, Mereu R, Palumbo I, Maffioli P, Randazzo S, Cicero AF. Oral fat load effects on inflammation and endothelial stress markers in healthy subjects. *Heart Vessels*. 2009;24:204–210.

Desgagné V, Guay SP, 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*. 2016 Jun 2;11(6):438-48.

DiPilato LM, Ahmad F, Harms M, Seale P, Manganiello V, Birnbaum MJ. The Role of PDE3B Phosphorylation in the Inhibition of Lipolysis by Insulin. *Mol Cell Biol*. 2015 Aug;35(16):2752-60.

Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes and Infection*. 2002;4:903-914.

Du J, Yuan Z, Ma Z, Song J, Xie X, Chen Y. KEGG-PATH: Kyoto encyclopedia of genes and genomes-based pathway analysis using a path analysis model. *Mol Biosyst*. 2014 Jul 29;10(9):2441-7.

Eldh M et al. Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: evaluation of different methods. *Mol Immunology*. 2012;50:278-286.

Emerson SR, Kurti SP, Harms CA, Haub MD, Melgarejo T, Logan C, Rosenkranz SK. Magnitude and Timing of the Postprandial Inflammatory Response to a High-Fat Meal in Healthy Adults: A Systematic Review. *Adv Nutr*. 2017 Mar 15;8(2):213-225.

Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection*. 2002 Jul;4(8):837-51. Review.

Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr*. 2007;86:1286 –92.

Faludi AA, Izar COM, Saraiva JFK, Chacra APM, Bianco HT, Afiune Neto A, Bertolami A, Pereira AC, Lottenberg AMP, Sposito AC, et al. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. *Arquivos brasileiros de cardiologia*; 2017;109:1-76.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009 Jan;19(1):92-105.

Fu Q, Qin T, Chen L, Liu CJ, Zhang X, Wang YZ, Hu MX, Chu HY, Zhang HW. miR-29a up-regulation in AR42J cells contributes to apoptosis via targeting TNFRSF1A gene. *World J Gastroenterol*. 2016 May 28;22(20):4881-90.

Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacology & Therapeutics*. 2003;100:171-194.

Ge Q, Gérard J, Noël L, Scroyen I, Brichard SM. MicroRNAs Regulated by Adiponectin as Novel Targets for Controlling Adipose Tissue Inflammation. *Endocrinology*. 2012 Nov; 153(11):5285–5296.

Ge Q, Brichard S, Yi X, Li Q. microRNAs as a new mechanism regulating adipose tissue inflammation in obesity and as a novel therapeutic strategy in the metabolic syndrome. *J Immunol Res*. 2014;2014:987285.

Ghanim H, Sia CL, Upadhyay M, Korzeniewski K, Viswanathan P, Abuatsheh S, et al. Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and Toll-like receptor expression. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2010;91(4):940-9.

Ghosh A, Gao L, Thakur A, Siu PM, Lai CWK. Role of free fatty acids in endothelial dysfunction. *J Biomed Sci*. 2017 Jul 27;24(1):50.

Ghoshal S, Witta J, Zhong J, de Villiers W, Eckhardt E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res*. 2009 Jan;50(1):90-7.

Ghorpade DS, Holla S, Kaveri SV, Bayry J, Patil SA, Balaji KN. Sonic hedgehog-dependent induction of microRNA 31 and microRNA 150 regulates Mycobacterium bovis BCG-driven toll-like receptor 2 signaling. *Mol Cell Biol*. 2013 Feb;33(3):543-56.

Gregor NF, Hotamisligil GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:415-445.

Gregersen S, Samocha-bonet D, Heilbronn LK, Campbell LV. Inflammatory and oxidative stress responses to high-carbohydrate and high-fat meals in healthy humans. *Journal of Nutrition and Metabolism*. 2012;2012:238056.

Guedes EC, França GS, Lino CA, Koyama FC, Moreira Ldo N, Alexandre JG, Barreto-Chaves ML, Galante PA, Diniz GP. MicroRNA Expression Signature Is Altered in the Cardiac Remodeling Induced by High Fat Diets. *J Cell Physiol*. 2016 Aug;231(8):1771-83.

Guo L, Liang T, Yu J, Zui Q. A comprehensive analysis of miRNA/isomiR expression with gender difference. *PLoS One*. 2016;11(5):e0154955.

Hammad S, Pu S, Jones PJ. Current Evidence Supporting the Link Between Dietary Fatty Acids and Cardiovascular Disease. *Lipids*. 2016 May;51(5):507-17.

Hammond SM. An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015;87:3–14.

Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesionmolecule 1. *Proc Natl Acad. Sci*. 2008;105:1516–1521.

Hatada EN, Krappmann D, Sheidereit C. NF-kappa B and the innate immune response. *Current Opinion in Immunology*. 2000;12:52-58.

Hartman L, Lago RAC. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Practice*. 1973; 22(8):475-497.

Hoebe K, Jiang Z, Georgel P, Tabeta K, Janssen E, Du X, Beutler B. TLR signaling pathways: opportunities for activation and blockade in pursuit of therapy. *Current Pharmaceutical Design*. 2006;12: a4123-4134.

Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-867.

Hulsmans M, De Keyzer D, Holvoet P. MicroRNAs regulating oxidative stress andinflammation in relation to obesity and atherosclerosis. *The FASEB Journal*. 2011 Aug;25.

Hwang DH, Kim JA, Lee JY. Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid. *Eur J Pharmacol*. 2016 Aug 15;785:24-35.

Jiang W, Liu G, Tang W. MicroRNA-182-5p Ameliorates Liver Ischemia-Reperfusion Injury by Suppressing Toll-Like Receptor 4. *Transplant Proc.* 2016 Oct;48(8):2809-2814.

Jiménez-Gómez Y, López-Miranda J, Blanco-Colio LM, Marín C, Pérez-Martínez P, Ruano J, Paniagua JA, Rodríguez F, Egido J, Pérez-Jiménez F. Olive oil and walnut breakfasts reduce the postprandial inflammatory response in mononuclear cells compared with a butter breakfast in healthy men. *Atherosclerosis.* 2009 Jun;204(2):e70-6.

Karalis KP, Giannogonas P, Kodela E, Koutmani Y, Zoumakis M, Teli T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. *FEBS Journal.* 2009;276(20):5747-54.

Kawai T, Akira S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology.* 2005;17:338-344.

Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet.* 2006;22:165-173.

Kim YJ, Hwang SJ, Bae YC, Jung JS. MiR-21 regulates adipogenic differentiation through the modulation of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Stem Cells.* 2009 Dec; 27(12):3093-102.

Kondkar AA, Abu-Amero KK. Utility of circulating microRNAs as clinical biomarkers for cardiovascular diseases. *Biomed Res Int.* 2015;2015:821823.

Lairon D, Lopez-Miranda J, Williams C. Methodology for studying postprandial lipid metabolism. *European Journal of Clinical Nutrition.* 2007;61:1145–1161.

Lam YY, Ha CW, Hoffmann JM, Oscarsson J, Dinudom A, Mather TJ, Cook DI, Hunt NH, Caterson ID, Holmes AJ, Storlien LH. Effects of dietary fat profile on gut permeability and microbiota and their relationships with metabolic changes in mice. *Obesity (Silver Spring).* 2015 Jul;23(7):1429-39.

Laugerette F, Alligier M, Bastard JP, Draï J, Chanséaume E, Lambert-Porcheron S, Laville M, Morio B, Vidal H, Michalski MC. Overfeeding increases postprandial endotoxemia in men: Inflammatory outcome may depend on LPS transporters LBP and sCD14. *Mol Nutr Food Res.* 2014 Jul;58(7):1513-8.

Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *Journal of Biological Chemistry.* 2001;276:16683-16689.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993; 75:843-854.

Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004; 23(20): 4051-60.

Legrand-Poels S, Esser N, L'homme L, Scheen A, Paquot N, Piette J. Free fatty acids as modulators of the NLRP3 inflammasome in obesity/type 2 diabetes. *Biochem Pharmacol*. 2014 Nov 1;92(1):131-41.

Ley K, Huo Y. VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001 May;107(10):1209-10.

Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2002; 2:725-734.

Liang et al. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics*. 2007;8:166.

Lin YY, Chou CF, Giovarelli M, Briata P, Gherzi R, Chen CY. KSRP and MicroRNA 145 are negative regulators of lipolysis in white adipose tissue. *Mol Cell Biol*. 2014 Jun;34(12):2339-49.

Ling HY, Wen GB, Feng SD, et al. MiRNA-375 promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation via modulation of ERK signaling. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011 April; 38(4): 239–246.

Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, et al. *Molecular Cell Biology*. 7^a edição. Nova Iorque: W. H. Freeman and Company; 2013.

Lorente-Cebrian S, Mejhert N, Kulyte'A, Laurencikiene J, et al. MicroRNAs Regulate Human Adipocyte Lipolysis: Effects of miR-145 Are Linked to TNF- α . 2014 Jan; 9(1):e86800.

Lv YN, Ou-Yang AJ, Fu LS. MicroRNA-27a Negatively Modulates the Inflammatory Response in Lipopolysaccharide-Stimulated Microglia by Targeting TLR4 and IRAK4. *Cell Mol Neurobiol*. 2017 Mar;37(2):195-210.

Magnani M, Crinelli R, Bianchi M, Antonelli A. The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor-kB (NF-kB). *Current Drug Targets*. 2000;1:387-399.

Mahoney DJ, Cheung HH, Mrad RL, Plenchette S, Simard C, Enwere E, Arora V, Mak TW, Lacasse EC, Waring J, Korneluk RG. Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF α -mediated NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 19;105(33):11778-83.

Martinez KB, Leone V, Chang EB. Western diets, gut dysbiosis, and metabolic diseases: Are they linked? *Gut Microbes*. 2017 Jan 6:1-13.

Maurel M, Chevet E. Endoplasmic reticulum stress signaling: the microRNA connection. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;304:C1117–C1126.

Meister G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet*. 2013;14(7):447-59.

Miwa H. High-performance liquid chromatographic determination of free fatty acids and esterified fatty acids in biological materials as their 2-nitrophenylhydrazides. *Analytica Chimica Acta*. 2002;465:237–255.

Moreira AP, Texeira TF, Ferreira AB, Peluzio Mdo C, Alfenas Rde C. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *British Journal of Nutrition*. 2012;108:801–809.

Moschos et al. Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BMC Genomics*. 2007;8:240.

Murakami Y, Tanabe S, Suzuki T. High-fat Diet-induced Intestinal Hyperpermeability is Associated with Increased Bile Acids in the Large Intestine of Mice. *J Food Sci*. 2016 Jan;81(1):H216-22.

Mushegian A, Medzhitov R. Evolutionary perspective on innate immune recognition. *Journal of Cell Biology*. 2001;155:705-710.

Nahid MA, Yao B, Dominguez-Gutierrez PR, Kesavalu L, Satoh M, Chan EK. Regulation of TLR2-mediated tolerance and cross-tolerance through IRAK4 modulation by miR-132 and miR-212. *J Immunol*. 2013;190:1250-63.

Nakamachi Y, Kawano S, Takenokuchi M, Nishimura K, Sakai Y, Chin T, Saura R, Kurosaka M, Kumagai S. MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60:1294–1304.

Nappo F, Esposito K, Cioffi M, Giugliano G, Molinari AM, Paolisso G, Marfella R, Giugliano D. Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Apr 3;39(7):1145-50.

Neilsen CT, Goodall GJ, Bracken CP. IsomiRs – the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends in Genetics*. 2012;28(11).

NEPA – NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). 4ª ed. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2011.

Neves AL, Coelho J, Couto L, Leite-Moreira A, Roncon-Albuquerque R Jr. Metabolic endotoxemia: a molecular link between obesity and cardiovascular risk. *J Mol Endocrinol*. 2013 Sep 11;51(2):R51-64.

O'keefe JH, Gheewala NM, O'keefe JO. Dietary strategies for improving post-prandial glucose, lipids, inflammation, and cardiovascular health. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;51(3):249-55.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva (Switzerland); 1995.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Global status report on noncommunicable diseases. Geneva (Switzerland); 2014.

Ortega FJ, Cardona-Alvarado MI, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, et al. Circulating profiling reveals the effect of a polyunsaturated fatty acid-enriched diet on common microRNAs. *J NutrBiochem*. 2015 Oct; 26(10):1095-101.

Pal D, Dasgupta S, Kundu R, Maitra S, Das G, Mukhopadhyay S, Ray S, Majumdar SS, Bhattacharya S. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid induced insulin resistance. *Nature medicine*. 2012;18:1279–1285.

Quintanilha BJ, Reis BZ, Duarte GBS, Cozzolino SMF, Rogero MM. Nutrimiromics: Role of microRNAs and Nutrition in Modulating Inflammation and Chronic Diseases. *Nutrients*. 2017 Oct 27;9(11). pii: E1168.

Remels AH, Langen RC, Gosker HR, Russell AP, Spaapen F, Voncken JW, Schrauwen P, Schols AM. PPARgamma inhibits NF-kappaB-dependent transcriptional activation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Jul;297(1):E174-83.

Ross SA, Davis CD. The Emerging Role of microRNA and Nutrition in Modulating Health and Disease. *Annu. Rev. Nutr*. 2014;34:305-36.

Ruiz-Núñez B, Pruimboomb L, Dijck-Brouwera DAJ, Muskieta FAJ. Lifestyle and nutritional imbalances associated with Western diseases: causes and consequences of chronic systemic low-grade inflammation in an evolutionary context. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013;24:1183–120.

Schmidt WM, Spiel AO, Jilma B, Wolzt M, Müller M. In vivo profile of the human leukocyte microRNA response to endotoxemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Mar 13;380(3):437-4.

Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessey EJ, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat. Immunol.* 2010;11:141–147.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Prevenção Cardiovascular. Rio de Janeiro (Brasil). *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 2013;101(6):1-63.

Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, Sung S, Morin R, Muranyi A, Hirst M, Hogge D, Marra M, Wells RA, Buckstein R, Lam W, Humphries RK, Karsan A. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med.* 2010 Jan;16(1):49-58.

Steimle A, Autenrieth IB, Frick JS. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2016 Aug;306(5):290-301.

Tan GC, Dibb N. IsomiRs have functional importance. *Malays J Pathol.* 2015;37(2):73-81.

Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103:12481–12486.

Takanabe R, Ono K, Abe Y, Takaya T, Horie T, Wada H, Kita T, Satoh N, Shimatsu A, Hasegawa K. Up-regulated expression of microRNA-143 in association with obesity in adipose tissue of mice fed high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Nov 28;376(4):728-32.

Tijssen AJ, Pinto YM, Creemers EE. Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for cardiovascular diseases. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology.* 2012;303(9):1085-95.

Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, Fabbri M, Alder H, Liu CG, Calin GA, Croce CM. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- α stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol.* 2007 Oct 15;179(8):5082-9.

Tornatore L, Thotakura AK, Bennett J, Moretti M, Franzoso G. The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation. *Trends Cell Biol.* 2012 Nov;22(11):557-66.

Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *Journal of Leukocyte Biology.* 2004;76:514-519.

Van Empel VP, De Windt LJ, Martins PAC. Circulating miRNAs: reflecting or affecting cardiovascular disease? *Current Hypertension Reports*. 2012;14(6):498-509.

Vlachos, Ioannis S., Konstantinos Zagganas, Maria D. Paraskevopoulou, Georgios Georgakilas, Dimitra Karagkouni, Thanasis Vergoulis, Theodore Dalamagas, and Artemis G. Hatzigeorgiou. DIANA-miRPath v3. 0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic acids research*. 2015:gkv403.

Verstak B, Nagpal K, Bottomley SP, Golenbock DT, Hertzog PJ, Mansell A. MyD88 adapter-like (Mal)/TIRAP interaction with TRAF6 is critical for TLR2- and TLR4-mediated NF-kappaB proinflammatory responses. *J Biol Chem*. 2009 Sep 4;284(36):24192-203.

Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011;13:423-33.

Xu G, Shi C, Ji C, Song G, Chen L, Yang L, Zhao Y, Guo X. Expression of microRNA-26b, an obesity-related microRNA, is regulated by free fatty acids, glucose, dexamethasone and growth hormone in human adipocytes. *Mol Med Rep*. 2014 Jul;10(1):223-8.

Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010;1803:1231–1243.

Wang L, Xu L, Xu M, Liu G, Xing J, Sun C, Ding H. Obesity-Associated MiR-342-3p Promotes Adipogenesis of Mesenchymal Stem cells by Suppressing ctBP2 and releasing C/EBP α from CtBP2 Binding. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(6):2285-98

Wang X, Zhu Y, Xu B, Wang J, Liu X. Identification of TLR2 and TLR4-induced microRNAs in human mesenchymal stem cells and their possible roles in regulating TLR signals. *Mol Med Rep*. 2016 Jun;13(6):4969-80.

Wang Y, Li T, Wu B, Liu H, Luo J, Feng D, Shi Y. STAT1 regulates MD-2 expression in monocytes of sepsis via miR-30a. *Inflammation*. 2014 Dec;37(6):1903-11.

Wang Y, Qian Y, Fang Q, Zhong P, Li W, Wang L, Fu W, Zhang Y, Xu Z, Li X, Liang G. Saturated palmitic acid induces myocardial inflammatory injuries through direct binding to TLR4 accessory protein MD2. *Nat Commun*. 2017 Jan 3;8:13997.

Weber JA, Baxter DH, Zhang S, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*. 2010;56(11):1733–1741.

Weber M, Baker MB, Moore JP, Searles CD. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;393:643–648.

Welsthom JO, Lai EC. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie*. 2011; 93(11):1897-1904.

Wendlandt EB, Graff JW, Gioannini TL, McCaffrey AP, Wilson ME. The role of microRNAs miR-200b and miR-200c in TLR4 signaling and NF- κ B activation. *Innate Immun*. 2012 Dec;18(6):846-55.

Wong SW, Kwon MJ, Choi AM, Kim HP, Nakahira K, Hwang DH. Fatty Acids Modulate Toll-like Receptor 4 Activation through Regulation of Receptor Dimerization and Recruitment into Lipid Rafts in a Reactive Oxygen Species-dependent Manner. *J Biol Chem*. 2009 Oct 2;284(40):27384-92.

Wu XY, Fan WD, Fang R, Wu GF. Regulation of microRNA-155 in Endothelial Inflammation by Targeting Nuclear Factor (NF)- κ B P65. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2014; 115:1928–1936.

Yang JS, Phillips MD, Betel D, Mu P, Ventura A, Siepel AC, Chen KC, Lai EC. Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA*. 2011 Feb;17(2):312-26.

Yang WM, Jeong HJ, Park SY, Lee W. Induction of miR-29a by saturated fatty acids impairs insulin signaling and glucose uptake through translational repression of IRS-1 in myocytes. *FEBS Lett*. 2014 Jun 13;588(13):2170-6.

Yang WM, Jeong HJ, Park SY, Lee W. Saturated fatty acid-induced miR-195 impairs insulin signaling and glycogen metabolism in HepG2 cells. *FEBS Lett*. 2014 Nov 3;588(21):3939-46.

Yang WM, Jeong HJ, Park SY, Lee W. Induction of miR-29a by saturated fatty acids impairs insulin signaling and glucose uptake through translational repression of IRS-1 in Myocytes. *FEBS Letters*. 2014;588:2170–2176.

Yang WM, Min KH, Lee W. MicroRNA expression analysis in the liver of high fat diet-induced obese mice. *Data Brief*. 2016 Dec 1;9:1155-1159. eCollection 2016.

Yang Y, Yang L, Zhu XLG. MicroRNA-155 Promotes Atherosclerosis Inflammation via Targeting SOCS1. *Cell PhysiolBiochem* 2015; 36:1371-1381.

- Yao F, Yu Y, Feng L, Li J, Zhang M, Lan X, Yan X, Liu Y, Guan F, Zhang M, Chen L. Adipogenic miR-27a in adipose tissue upregulates macrophage activation via inhibiting PPAR γ of insulin resistance induced by high-fat diet-associated obesity. *Exp Cell Res*. 2017 Mar 30; pii: S0014-4827(17)30189-1.
- Ye X, Huang N, Liu Y, Paroo Z, Huerta C, Li P, Chen S, Liu Q, Zhang H. Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(6):650-7.
- Xiao L, Liu Y, Wang N. New paradigms in inflammatory signaling in vascular endothelial cells. *American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology*. 2014;306(3):H317-25.
- Zhang Z, Zhang M, Zhong M, Suo Q, LV K. Expression profiles of miRNAs in polarized macrophages. *International Journal of Molecular Medicine*. 2013;31:797-802.
- Zhang L, Dong LY, Li YJ, Hong Z, Wei WS. The microRNA miR-181c controls microglia-mediated neuronal apoptosis by suppressing tumor necrosis factor. *J Neuroinflammation*. 2012 Sep 6;9:211.
- Zhang Y, Fan M, Zhang X, Huang F, Wu K, Zhang J, Liu J, Huang Z, Luo H, Tao L, Zhang H. Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs. *RNA*. 2014 Dec;20(12):1878-89.
- Zhou X, Jiao Z, Ji J, Li S, Huang X, Lu X, Zhao H, Peng J, Chen X, Ji Q, Ji Y. Characterization of mouse serum exosomal small RNA content: The origins and their roles in modulating inflammatory response. *Oncotarget*. 2017 Jun 27;8(26):42712-42727.

ANEXOS

ANEXO 1

Cartaz de divulgação do estudo para recrutamento de voluntárias

RECRUTA VOLUNTÁRIAS para pesquisa científica sobre Epigenômica Nutricional, Lipídios e Inflamação

Requisitos:

Sexo feminino;

Idade entre 18 e 40 anos;

Não fumante;

Não ser vegetariano;

Não ter nenhum problema de saúde.

Interessadas:

Falar com Bruna

E-mail: bquinta@hotmail.com

Telefone: (11) 95559-9891

Projeto sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero

Aprovado pelo Comitê de Ética (nº do protocolo: 498.686)

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

ANEXO 2

Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

TÍTULO: Efeito do suco de uva integral associado a uma refeição hiperlipídica sobre a resposta inflamatória pós-prandial em mulheres saudáveis

INTRODUÇÃO

Estudos científicos sugerem que a ingestão de uma refeição com alta quantidade de gorduras seja capaz de elevar a concentração sanguínea de triacilglicerol, bem como de marcadores inflamatórios, nas primeiras horas após o seu consumo. Em indivíduos saudáveis, essas substâncias retornam à concentração inicial logo após os nutrientes serem metabolizados. No entanto, a dieta rica em lipídios, quando consumida habitualmente, pode provocar uma inflamação crônica, que é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do diabetes e das doenças cardiovasculares. A proposta deste estudo é avaliar se o suco de uva integral tem a capacidade de atenuar a resposta inflamatória gerada pelo consumo de uma refeição rica em lipídios.

COMO É O ESTUDO?

O participante do estudo consumirá um café da manhã preparado pelos nossos pesquisadores em três momentos (intervalo de duas semanas entre cada café da manhã: (I) café da manhã + água, (II) café da manhã + água com açúcar e (III) café da manhã + suco de uva. Em cada momento, o sangue será coletado antes da refeição e 1, 3 e 5 horas após a sua ingestão. O volume de sangue coletado a cada tempo será de 20 mL, o qual será utilizado para avaliar a concentração de glicose, insulina, perfil lipídico, lipopolissacarídeos (LPS), hormônios gastrointestinais ligados à saciedade e biomarcadores inflamatórios, bem como avaliar, em glóbulos brancos, a expressão de genes, microRNAs e proteínas envolvidas na inflamação.

OUTRAS INFORMAÇÕES

O participante não terá nenhum custo por participar da pesquisa.

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

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

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

- Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero – Investigador Principal: fone (11-3061-7850).
- Bruna Jardim Quintanilha - aluna de mestrado da Faculdade de Saúde Pública da USP: fone (11-3061-7850)

- Você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da USP (11-3061-7779) que fica na Av. Dr. Arnaldo, 715 - São Paulo - SP -Brasil - CEP - 01246-904. O Horário de funcionamento do Comitê de Ética da Faculdade deSaúde Pública da USP é das 8 h às 12 h.

O Comitê de Ética em Pesquisa é um comitê interdisciplinar, constituído por profissionais de ambos os sexos, além de pelo menos um representante da comunidade. Este comitê tem como objetivo proteger o bem-estar de indivíduos que participam de pesquisas científicas, bem como orientar e regulamentar pesquisas e

atividades práticas que envolvam intervenções com seres humanos, de modo a garantir e resguardar a integridade e os direitos dos sujeitos da pesquisa.

COMO PARTICIPAR?

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

Declaro que li o termo de consentimento livre e esclarecido para esse estudo e aceito participar voluntariamente desse estudo.

Ainda, declaro que recebi todos os esclarecimentos necessários para compreender o estudo e tive tempo suficiente para decidir minha participação no estudo.

Nome do Participante: _____
(ou representante legal)

Assinatura do Participante: _____ **Data:** _____
(ou representante legal)

Investigador: _____

Assinatura: _____ **Data:** _____

ANEXO 3

Instruções entregues às voluntárias

Glossário

DCNT - Doenças crônicas não transmissíveis
AG - Ácidos graxos
AGNE - Ácidos graxos não esterificados
AGO - Proteína Argonauta
AGS - Ácidos graxos saturados
AP-1 - Ativador da proteína-1
CBA - Compostos bioativos dos alimentos
clAP1/2 - Inibidor celular de apoptose 1 e 2
CLA - Ácido linoléico conjugado
DAMP - Padrões moleculares associados a danos
DHA - Ácido docosa-hexaenóico
IKK - Complexo I κ B quinases
IL-6 - Interleucina 6
INSR - Receptor de insulina
IRAK - Quinase associada ao receptor de IL-1
IRS-1 - Substrato do receptor de insulina 1
I κ B - Inibidores κ B
LBP - Proteína ligante de lipopolissacarídeo
LHS - Lipase hormônio sensível
LPS - Lipopolissacarídeo
MAPK/MKK - Quinase ativada por mitógeno
miRNA - microRNA
MyD88 - Proteína de diferenciação mieloide 88
NF- κ B - Fator nuclear kappa B
PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos
PBMC - Células mononucleares do sangue periférico
PCR - Proteína C reativa
PDE3B - Enzima fosfodiesterase 3B
PUFA - Ácidos graxos poli-insaturados
QM - Quilomicrons
Rip1 - Quinase de interação com receptor 1
RISC - Complexo-RNA de indução de silenciamento
SAA - Proteína sérica amilóide A
SOCS-1 - Supressor de sinalização de citocinas 1
TLR-4 - Receptor do tipo Toll 4
TNF- α - Fator de necrose tumoral α

TRADD - Domínio da morte associado ao TNFR

TRAF6 - Fator 6 associado ao receptor de TNF

UTR - Região não traduzida

VCAM-1 - Molécula de adesão celular vascular 1

Bruna Jardim Quintanilha

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/0658073454325624>
Última atualização do currículo em 08/01/2018

Graduada em Nutrição pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP) (2012). Mestranda em Nutrição em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Laboratório de Genômica Nutricional e Inflamação, com enfoque em epigenômica Nutricional, microRNA, dieta hiperlipídica e nutrigenômica. Faz parte do Food Research Center (FoRC), CEPID da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Tem experiência em Nutrição Clínica e Marketing Nutricional. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Bruna Jardim Quintanilha
Nome em citações bibliográficas	QUINTANILHA, B. J.;QUINTANILHA, BRUNA

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2015	Mestrado em andamento em Nutrição em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP-USP, Brasil. Título: EFEITO DE UMA REFEIÇÃO HIPERLIPÍDICA NO PERÍODO PÓS-PRANDIAL SOBRE A EXPRESSÃO DE MICRORNA EM MULHERES SAUDÁVEIS.,Orientador: Marcelo Macedo Rogero. Palavras-chave: microRNA; Epigenética; Dieta Hiperlipídica; Efeito pós-prandial; LPS; Inflamação. Grande área: Ciências da Saúde
2008 - 2012	Graduação em Nutrição. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Formação Complementar

2010 - 2010	Extensão universitária em Curso Introdutório à Liga de Controle de Diabetes. (Carga horária: 12h). Faculdade de Medicina - USP, FM/USP, Brasil.
2010 - 2010	Extensão universitária em Suplementação Nutricional. (Carga horária: 54h). Escola de Educação Física e Esporte - USP, EEFE, Brasil.
2009 - 2009	Extensão universitária em Atualização da Liga de Síndrome Metabólica. (Carga horária: 9h). Faculdade de Medicina - USP, FM/USP, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - 2012	Vínculo: Iniciação Científica, Enquadramento Funcional: Participante, Carga horária: 6
--------------------	--

Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP-USP, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2008	Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Participante, Carga horária: 6
--------------------	---

Marcelo Macedo Rogero

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2

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

Última atualização do currículo em 05/01/2018

Graduado em Nutrição pela Universidade de São Paulo (1994), Mestrado em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (2002) e Doutorado em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (2007). Pós-doutorado em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (2007-2008). Pós-doutorado pela Faculdade de Medicina da Universidade de Southampton, Inglaterra (2012-2013). Professor Associado, em Regime de Dedicação Integral à Docência e à Pesquisa, junto ao Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública - USP desde 2009. Vice-coordenador do Programa de Pós-graduação Nutrição em Saúde Pública da FSP-USP. É Pesquisador Associado do FoRC (Food Research Center), um dos Centros de Inovação, Pesquisa e Difusão (CEPIDs) apoiados pela FAPESP. Professor Pesquisador do projeto intitulado "Impact of the omega-3 fatty acid in the homeostasis of adipose tissue and physico-chemical properties and oxidative of lipoproteins: a parallel among experimental model and clinical study" referente ao PROGRAMA CAPES/STINT - EDITAL Nº. 075/2013-2014, em parceria com a Universidade de Umea, Suécia. 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

Endereço

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

Formação acadêmica/titulação

2003 - 2007	Doutorado em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Efeito do desmame precoce e da suplementação com glutamina, in vitro e in vivo, sobre a funcionalidade de macrófagos peritoniais e o estado nutricional de camundongos, Ano de obtenção: 2007. Orientador: Julio Orlando Tirapegui Toledo. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
1999 - 2002	Mestrado em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Efeitos do exercício e da suplementação com L-glutamina e L-alanil L-glutamina 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. Grande área: Ciências Agrárias 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.
1991 - 1994	