



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO-UNIRIO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – PPGAN

Maria Fernanda de Oliveira

**ANÁLISE DO CONTEÚDO DE miR159 EM AMOSTRAS DE BROTOS
COMESTÍVEIS E MICROVERDES DE SEIS ESPÉCIES CULTIVADAS**

RIO DE JANEIRO

2023

Maria Fernanda de Oliveira

**ANÁLISE DO CONTEÚDO DE MIR159 EM AMOSTRAS DE BROTOS
COMESTÍVEIS E MICROVERDES DE 6 ESPÉCIES CULTIVADAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Elizabeth Cavalcante Fai

Coorientadora: Profa. Dra. Marta Citelli dos Reis

RIO DE JANEIRO

2023

Catálogo informatizado pelo(a) autor(a)

048 Oliveira, Maria Fernanda de
Análise do conteúdo de MIR159 em amostras de brotos
comestíveis e microverdes de seis espécies cultivadas /
Maria Fernanda de Oliveira. -- Rio de Janeiro, 2023.
41 f.

Orientadora: Ana Elizabeth Cavalcante Fai.
Coorientadora: Marta Citelli dos Reis.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Alimentos e
Nutrição, 2023.

1. Nutrição. 2. Alimentos germinados. 3. Transferência
entre reinos. I. Fai, Ana Elizabeth Cavalcante, orient.
II. Reis, Marta Citelli dos, coorient. III. Título.



**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ALIMENTOS E NUTRIÇÃO PARA CONCESSÃO DO GRAU DE MESTRE EM ALIMENTOS E
NUTRIÇÃO**

DATA DA DEFESA: 31 de outubro de 2023

CANDIDATA: Maria Fernanda de Oliveira

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Elizabeth Cavalcante Fai

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Ana Elizabeth Cavalcante Fai (Presidente) – PPGAN / UNIRIO

Prof. Dr. Otniel Freitas Silva - PPGAN / EMBRAPA

Profa. Dra. Roberta Fontanive Miyahira – UERJ

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação da expressão de MIR159 ao longo do desenvolvimento de brotos e microverdes.

LOCAL: Escola de Nutrição (UNIRIO) - Sala 07.

HORA DE INÍCIO: 10h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 30 minutos, o(a) candidato(a) foi arguido oralmente pelos membros da banca tendo como resultado:

APROVADO(A)

NÃO APROVADO(A)

Em acordo com o capítulo VIII, artigo 62 do Regulamento do PPGAN, o candidato no prazo máximo de 30 (trinta) dias para Dissertações/Tese aprovadas deve entregar as cópias exigidas pelo Regulamento do PPGAN da versão final à secretaria como condição final para a expedição do diploma.

[Esta ata vai assinada digitalmente por todos os participantes](#)

Rio de Janeiro, 31 de outubro de 2023





Ata_Defeca_Dicertação_Nº.88_Maria Fernanda de Oliveira

Data e Hora de Criação: 06/11/2023 às 12:37:03

Documentos que originaram esse envelope:

- Ata_Defeca_Dicertac_a-o_Nº.88_Maria Fernanda de Oliveira (1).docx (Documento Microsoft Word) - 1 página(s)



Hashs únicas referente à esse envelope de documentos

[SHA256]: 078032926479a0e47ba947c973e12fecc2d6d7a059c709f947e439050af

[SHA256]: 03d5e7a01e902b32e185dec7a031301bd4e02624634c234e1e61470a601a0bb94a0204a0f0c005f0e50c70ca7199c73982359f3a0f0e070c490322

Lista de assinaturas solicitadas e associadas à esse envelope



ASSINADO - Ana Elizabeth Cavalcante Fai (bethfai@yahoo.com.br)

Data/Hora: 06/11/2023 - 15:54:34, IP: 152.92.152.90, Geolocalização: [-22.911197, -40.237050]

[SHA256]: 9b174550490c899c0c217099cb72f0e40080ca5b9407643e09a72320c879c

Ana Elizabeth Cavalcante Fai



ASSINADO - Otneil Freitas Silva (otneil.freitas@embrapa.br)

Data/Hora: 07/11/2023 - 01:09:36, IP: 177.87.140.159

[SHA256]: 067914ad43d7b7c0046d01dcd3600a2030c3de21eac34e452940de7d5f



ASSINADO - Roberta Fontaine Miyahira (robertamiyahira@gmail.com)

Data/Hora: 06/11/2023 - 15:46:36, IP: 159.122.19.245

[SHA256]: e4960c7903f044d841ba5c7016020c36a1f4b5374eac09f3c25851f52

Histórico de eventos registrados neste envelope

07/11/2023 01:09:36 - Envelope finalizado por otneil.freitas@embrapa.br, IP 177.87.140.159

07/11/2023 01:09:36 - Assinatura realizada por otneil.freitas@embrapa.br, IP 177.87.140.159

06/11/2023 15:54:34 - Assinatura realizada por bethfai@yahoo.com.br, IP 152.92.152.90

06/11/2023 15:46:36 - Assinatura realizada por robertamiyahira@gmail.com, IP 159.122.19.245

06/11/2023 12:42:30 - Envelope registrado na Blockchain por ppgan.secretaria@unirio.br, IP 200.156.27.159

06/11/2023 12:42:31 - Envelope encaminhado para assinatura por ppgan.secretaria@unirio.br, IP 200.156.27.159

06/11/2023 12:37:07 - Envelope criado por ppgan.secretaria@unirio.br, IP 200.156.27.159



Documento em conformidade com o padrão de assinatura digital ICP-Brasil e
validado de acordo com o Instituto Nacional de Tecnologia da Informação

Os registros de assinaturas presentes nesse documento pertencem única e exclusivamente a esse envelope.

Documento final gerado e certificado por Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro



Dedico esse trabalho a Deus, à minha família, às queridas orientadoras, aos colegas de laboratório e a todos os que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, minha maior gratidão a Deus. Minha família, amigos e colegas também devem ser lembrados neste momento, pois em tempos de pandemia, para empreender em tão difícil jornada, é necessário o esforço de muitas pessoas.

Ao Colégio Pedro II, onde terminei os meus estudos do segundo grau e vivi a maior parte de minha vida escolar.

Às minhas orientadoras, que além de tudo, com sua dedicação e carinho, serviram de inspiração para este Mestrado.

Aos componentes que compõem a banca examinadora, que também agregam enormemente a esta pesquisa.

Agradeço ao PPGAN pela oportunidade de fazer parte do Programa, por toda estrutura de trabalho, o apoio ao meu projeto e pelo incentivo a pesquisa e a produção de diversos trabalhos científicos.

À UERJ, onde foram feitas a maior parte das análises deste trabalho.

Agradeço ainda à CAPES pela bolsa concedida para execução do Mestrado.

Só uma coisa morta segue a correnteza. É
preciso estar vivo para contrariá-la.

(G. K. Chesterton)

RESUMO

A teoria de regulação cruzada entre reinos, no âmbito de alimentos e nutrição, pode ser descrita como a potencial transmissão de material genético bioativo entre alimentos de origem vegetal e mamíferos. MicroRNAs (miR) são moléculas destacadas como possíveis executoras deste fenômeno. Pesquisas que visem o desenvolvimento e validação de métodos analíticos, para a detecção destes miRs e que corroborem para um melhor entendimento da teoria de regulação cruzada entre reinos e espécies pode trazer à luz a possibilidade de miRs atuarem de fato como moléculas efetoras de origem dietética, configurando como mais um potencial composto bioativo de alimentos. O presente estudo trabalhou com a hipótese de que os alimentos da classe de brotos comestíveis e microverdes, por serem plantas em estágio primário de desenvolvimento, logo, com síntese acelerada de proteínas, devem sofrer modulação da síntese de miR, principalmente o miR159, que atua junto ao hormônio vegetal ácido abscísico (ABA), responsável pela dormência de sementes. Além disso, há evidências de potencial antitumoral exercido pelo miR159 em células humanas. Nesse sentido, este estudo teve como objetivos: analisar a expressão do miR159 ao longo de 14 dias após a germinação em amostras de 6 vegetais consumidos na forma de brotos comestíveis e microverdes; e determinar qual amostra apresenta o maior conteúdo. As espécies selecionadas para esse estudo foram: mostarda (*Brassica juncea*), brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*), repolho roxo (*Brassica oleracea* var. *capitata*), agrião (*Nasturtium officinale*), chia (*Salvia hispanica*) e beterraba (*Beta vulgaris*). As espécies foram cultivadas com o substrato perlita e vermiculita, na proporção de 1:1 ou, no caso da chia, sobre papel de filtro. O processo de germinação ocorreu à temperatura ambiente (20-25°C), com uma umidade relativa de ~70% e um intervalo de iluminação de 12 horas no escuro e 12 horas sob luz LED. As amostras foram pulverizadas com água destilada duas vezes por dia (de manhã e à noite) em quantidade suficiente para manter a umidade constante. O processo de germinação foi efetuado durante 14 dias. O repolho roxo foi cultivado durante um período mais longo (90 dias). O reagente TRIzol™ foi utilizado para extração do RNA e após o tratamento das amostras com DNase, a quantificação foi realizada em espectrofotômetro *BioDrop μLITE* através da análise da absorvância a 260nm. A quantificação do miR159 foi realizada utilizando o sistema de PCR em tempo real *Applied Biosystems 7500* e o kit *TaqMan MicroRNA Assay (Life Technologies)* após a transcrição reversa ter sido efetuada utilizando o kit *TaqMan microRNA (Life Technologies)*. Os resultados dos testes de PCR em tempo real demonstraram que as amostras de agrião apresentaram a maior expressão relativa de miR159 em quaisquer dos dias analisados, e as de mostarda a menor. De uma maneira geral, ainda foi possível identificar uma tendência de diminuição da expressão relativa de miR159 nas amostras ao longo do período, que foi ainda menor na amostra de planta adulta. As amostras de microverde de beterraba, por sua vez, foram as únicas que apresentaram aumento da expressão de miR159 quando comparadas aos brotos. Conclui-se que existe modulação de conteúdo relativo de miR159 dos vegetais analisados nas fases de broto e microverde, sendo as amostras de agrião de 7 dias as que apresentaram a maior expressão relativa. Estes dados indicam que, para investigações futuras sobre miR159, os brotos e microverdes podem ser amostras de interesse por apresentarem modulação ao longo de seu desenvolvimento.

Palavras-chave: nutrição; alimentos *plant-based*; alimentos germinados; transferência entre reinos, miR vegetais.

ABSTRACT

The theory of cross-regulation between kingdoms, in the context of food and nutrition, can be described as the potential transmission of bioactive genetic material between foods of plant origin and mammals. MicroRNAs (miR) are molecules highlighted as possible executors of this phenomenon. Research aimed at developing and validating analytical methods for detecting these miRs and contributing to a better understanding of the theory of cross-regulation between kingdoms and species could shed light on the possibility of miRs actually acting as effector molecules of dietary origin, configuring them as another potential bioactive compound in food. This study worked on the hypothesis that foods from the edible sprouts and microgreens class, as they are plants in the primary stage of development and therefore have accelerated protein synthesis, should undergo modulation of miR synthesis, especially miR159, which acts together with the plant hormone abscisic acid (ABA), responsible for seed dormancy. Furthermore, there is evidence of antitumor potential exerted by miR159 in human cells. Therefore, this study aimed to analyze the expression of miR159 over 14 days after germination in samples of 6 vegetables consumed in the form of edible sprouts and microgreens; and determine which has the highest content. The species selected for this study were mustard (*Brassica juncea*), broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), red cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*), watercress (*Nasturtium officinale*), chia (*Salvia hispanica*) and beet (*Beta vulgaris*). The species were grown in a substrate of perlite and vermiculite in a ratio of 1:1 or, in the case of chia, on filter paper. The germination process took place at room temperature (20-25°C), with a relative humidity of ~70% and an illumination interval of 12 hours in the dark and 12 hours under LED light. The samples were sprayed with distilled water twice a day (morning and evening) in sufficient quantity to maintain constant humidity. Germination took place over 14 days. Red cabbage was grown for a longer period (90 days). The TRIzol™ reagent was used for RNA extraction and after treating the samples with TURBO™ DNase (Life Technologies), quantification was carried out in a BioDrop μLITE spectrophotometer by analyzing the absorbance at 260nm. Quantification of miRNA 159 was realized using the Applied Biosystems 7500 real-time PCR system and the TaqMan MicroRNA Assay kit (Life Technologies) after reverse transcription had been carried out using the TaqMan microRNA kit (Life Technologies). The results of the real-time PCR tests showed that the watercress samples had the highest relative expression of miR159 on any of the assayed days and the mustard samples the lowest. In general, it was also possible to identify a downward trend in the relative expression of miR159 in the samples over the period, which was even lower in the adult plant sample. The beet microgreen samples, on the other hand, were the only ones to show an increase in miR159 expression when compared to the shoots. It can be concluded that there is modulation in the relative miR159 content of the vegetables analyzed at the sprout and micro-green stages, with the 7-day-old watercress samples showing the highest relative expression. These data indicate that, for future research into dietary miR159, sprouts and microgreens may be samples of interest because they showed modulation throughout their development.

Keywords: nutrition; plant-based foods; sprouted foods; transfer between kingdoms, plant miR.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Típica germinação de 14 dias em dicotiledôneas.....	13
Figure 1. Relative expression of miR159 of 6 plants analysed over a period of 14 days after seed germination. MiR159 expression is relative to the third day of germination of each species, respectively.....	25
Figure 2. Comparison of miR159 expression among the 6 analysed species.....	27
Figure 3. Relative miR159 contents in cabbage throughout plant development, including adult samples.....	28

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Alguns estudos sobre a transferência de miRNA entre plantas e animais e principais resultados encontrados.....	19
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido abscísico
miR	MicroRNA
miR159	MicroRNA 159
smiR	Small microRNA
RNA _m	RNA mensageiro
xenomiR	miR exógenos

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – UMA BREVE REVISÃO SOBRE A TEORIA DE TRANSFERÊNCIA ENTRE REINOS.....	18
1. Introdução.....	19
2. Metodologia.....	19
3. Resultado e discussão.....	19
4. Considerações finais.....	25
CAPÍTULO 2 – MODULATION OF MIR159 IN FOOD SPECIES: FROM SPROUTS TO MICROGREENS.....	29
1. Introduction.....	30
2. Material and metods.....	31
2.1. Sample and Cultivation.....	31
2.2. RNA extraction.....	32
2.3. Evaluation of RNA integrity and quantification.....	32
2.4. Quantification and analysis of miR159.....	32
2.5. Statistical analyses.....	33
3. Results and discussion.....	33
3.1. Modulation of miR159 throughout the plant development.....	33
3.2. Relative miR159 contents in the studied samples.....	34
3.3. Relative miR159 contents in adult sample.....	36
4. Conclusion.....	36
CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

As diretrizes atuais de alimentação e nutrição estimulam o consumo de dietas do tipo baseada em plantas, onde predominam alimentos de origem vegetal, devido as evidências científicas que veem relacionando a dieta consumida com estado de saúde. Além do importante aspecto nutricional, esse tipo de dieta também seria ambientalmente mais sustentável (Miyahira *et al.*, 2021). Mudanças do estilo de vida do consumidor levaram ao aumento do interesse por novos alimentos frescos, como brotos e microverdes, que vem sendo promovidos como alimentos funcionais, capazes de desempenhar benefícios à saúde além dos nutricionais (Ebert, 2022). Microverdes e brotos comestíveis são plantas em estágio inicial de desenvolvimento, normalmente consumidos crus (Figura 1.). Os brotos são grãos germinados, na maioria das vezes cultivados em água por período dependente da espécie e são consumidos de forma integral. Já os microverdes, são vegetais em estágio um pouco mais desenvolvido, com o primeiro par de folhas verdadeiras, são cultivados em solo ou substitutos de solo, e tem somente as partes aéreas das plantas colhidas (Reed *et al.*, 2018).

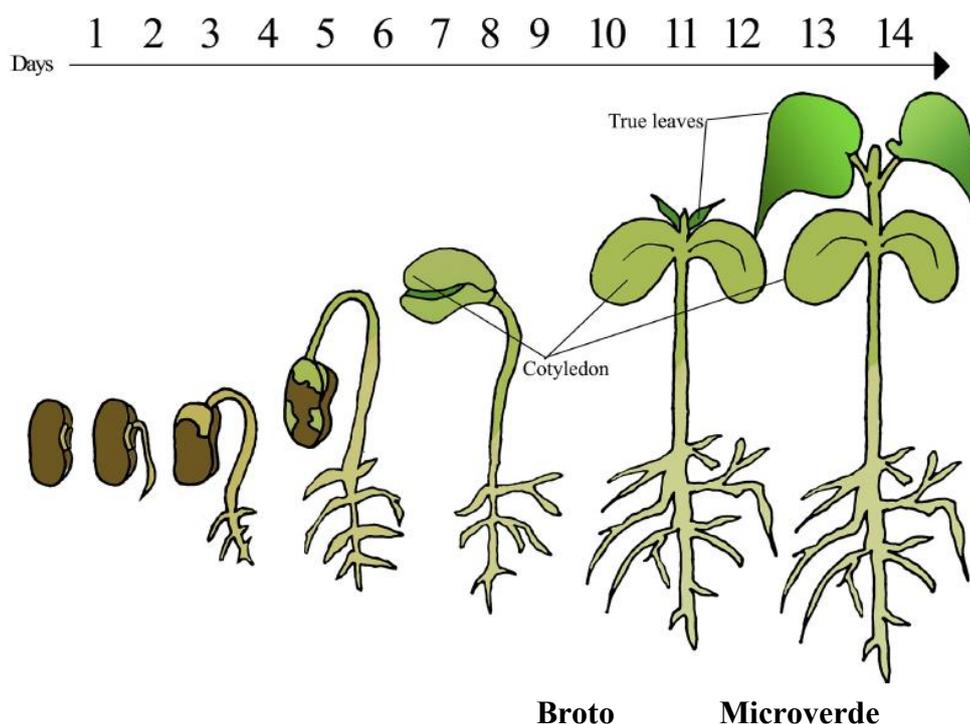


Figura 1. Típica germinação de 14 dias de dicotiledôneas. Diferenças entre brotos e microverdes por tempo de colheita. O feijão comum foi usado como modelo. O período de germinação varia de acordo com a espécie do vegetal. FONTE: Riggio *et al.*, 2019.

No ano de 2012, com a publicação de Zhang *et al.* 2012, foi proposta que teoria chamada regulação cruzada entre reinos fosse aplicada à nutrição, teorizando assim um fenômeno de captação de material genético dos vegetais consumidos na dieta pelo organismo receptor e posterior transporte e distribuição pelos tecidos via corrente sanguínea, possibilitando modulação da expressão gênica do hospedeiro. Os miR vegetais apresentam algumas vantagens como moléculas propostas, pois podem se associar a componentes protetores (como proteínas Argonauta), ter uma sequência característica de CG e um grupamento metil no nucleotídeo terminal, conferindo para essa classe uma maior resistência ao pH ácido, à atividade enzimática e à temperatura de fervura (Olmí *et al.*, 2023). O miR159, que não encontra homólogo em mamíferos, atua nos vegetais controlando o ciclo celular, morfologia e desenvolvimento, demonstrou em pesquisa capacidade de inibir a proliferação de células tumorais de câncer de mama de maneira específica, não afetando células saudáveis (Chin *et al.*, 2016).

A bibliografia também aponta resultados contrários ao fenômeno, como importante degradação de miR proveniente de milho ao longo da digestão de camundongos (Huang *et al.*, 2018) e distribuição ineficiente de miR dietético pelos tecidos do organismo receptor (Snow *et al.*, 2013). Por tudo já apresentado, é possível afirmar que este tema é controverso e que necessita de mais estudos, tanto para esclarecer os mecanismos de ação, absorção e distribuição, como também de variáveis que são capazes de impactar a presença de miR em alimentos. Este estudo, depois de investigação bibliográfica, se propôs a avaliar a importância do desenvolvimento vegetal na modulação da expressão do miR159 em espécies que podem ser consumidas nas fases de broto e microverde, e estipular qual amostra apresenta maior quantidade do miR159. Para apresentação deste documento, os capítulos serão apresentados na forma de dois artigos científicos e ao final será apresentada uma conclusão geral.

No primeiro capítulo é apresentado um artigo de revisão com o título de *Uma breve revisão sobre a teoria de transferência de miRNA entre reinos*, publicado na revista *Research, Society and Development*. A pesquisa bibliográfica sobre o tema da possível transferência de material genético com ação bioativa entre plantas e animais contou com artigos que corroboram e não corroboram com a ideia. Analisando e discutindo os dados, foram pontuadas as críticas pertinentes a teoria, como a quantidade, a biodisponibilidade, a bioatividade e a importância da microbiota intestinal quanto aos miR dietéticos. Foram estudadas ainda as variáveis que podem causar impacto no conteúdo de miR em alimentos, como o cozimento e o processo digestório. Com este artigo foi possível constatar a necessidade de mais estudos sobre este tema, inclusive

pesquisas sobre o impacto que o estágio de desenvolvimento poderia causar no conteúdo de miR de vegetais dietéticos.

O segundo capítulo compreende o artigo original *Modulation of miR159 in 6 food species: from sprouts to microgreens* que será submetido à revista *Plant Food for Human Nutrition*. Neste artigo, 6 espécies de vegetais dietéticos foram cultivadas e a expressão de miR159 foi analisada nos pontos de 3, 7 e 14 dias após a germinação (nas fases de broto e microverde), desta forma sendo possível acompanhar sua modulação ao longo do período. Ao analisar os resultados foi possível identificar uma tendência de diminuição da expressão relativa do miR estudado quando comparando vegetais da mesma espécie. Também foi possível identificar que as amostras de agrião apresentaram a maior expressão dentre as estudadas. Este estudo pode indicar que o estado de desenvolvimento vegetal influencia na expressão do miR159 em plantas comestíveis no período estudado, o que pode contribuir com mais estudos de análise de miR proveniente da dieta.

Referências

- Miyahira, R. F., Lopes, J. O., Antunes, A. E. C. (2021). The Use of Sprouts to Improve the Nutritional Value of Food Products: A Brief Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 76, 143–152.
- Ebert, A. W. (2022). Sprouts and Microgreens—Novel Food Sources for Healthy Diets. *Plants*, 11, 571.
- Reed, E., Ferreira, C. M., Bell, R., Brown, E. W., Zheng, J. (2018). Plant-Microbe and Abiotic Factors Influencing Salmonella Survival and Growth on Alfalfa Sprouts and Swiss Chard Microgreens. *Applied and Environmental Microbiology*, 84, 9.
- Riggio, G. M., Wang, Q., Knielb, K. E., Gibson, K. E. (2019) Microgreens—A review of food safety considerations along the farm to fork continuum. *Int. J. Food Microbiol.* 290:76–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.027>
- Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., Zhang, Y., Li, J., Bian, Z., Liang, X., Cai, X., Yin, Y., Wang, C., Zhang, T., Zhu, D., Xu, J., Chen, Q., Ba, Y., Liu, J., Wang, Q., Chen, J., Wang, J., Wang, M., Zhang, Q., Zhang, J., Zen, K., & Zhang, C. Y. (2012). Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research*, 22(1), 107-126.
- Olmi, L., Pepe, G., Helmer-Citterich, M., Canini, A., Gismondi, A. (2023). Looking for Plant microRNAs in Human Blood Samples: Bioinformatics Evidence and Perspectives. *Plant Foods for Human Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s11130-023-01063-9>.
- Chin, Fong, M. Y., Somlo, G., Wu, J., Swiderski, P., Wu., Wang, S. E. (2016). Cross-kingdom Inhibition of Breast Cancer Growth by Plant miR159. *Cell Research*, 26, 217-228.
- Huang, H., Davis, C. D., Wang, T. T. Y. (2018). Extensive Degradation and Low Bioavailability of Orally Consumed Corn miRNAs in Mice. *Nutrients*, 10, 215.
- Snow, J. W., Hale, A. E., Isaacs, S. K., Baggish, A. L., Chan, S. Y. (2013). Ineffective Delivery of Diet-derived MicroRNAs to Recipient Animal Organisms. *RNA Biology*, 10(7), 1107-1116.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão do miR159 ao longo do processo de germinação de grãos comestíveis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um *screening* para seleção das espécies de grãos comestíveis para avaliação do miR159;
- Comparar os níveis de expressão do miR159 antes e após a germinação de grãos ao longo de 14 dias.

CAPÍTULO 1

Este artigo foi publicado pela revista Research, Society and Development, v. 10, n. 3, e39510313580, 2021; doi: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd3-v10i3.13580>

Uma breve revisão sobre a teoria de transferência de miRNA entre reinos

A brief review of the theory of cross-kingdom miRNA transfer

Una breve revisión de la teoría de la transferencia de miRNA entre reinos

Recebido: 05/03/2021 | Revisado: 11/03/2021 | Aceito: 12/03/2021 | Publicado: 20/03/2021

Maria Fernanda de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4492-6919>

Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: pomona.br@gmail.com

Ana Elizabeth Cavalcante Fai

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8594-2667>

Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: bethfai@yahoo.com.br

Marta Citelli

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1380-3729>

Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: martacitellir@gmail.com

Resumo

Recentemente, o meio acadêmico vem discutindo a teoria chamada de “cross-kingdom transfer”, em tradução livre “transferência cruzada entre reinos” no âmbito nutricional. Esta tem ideia de que material genético bioativo tem o potencial de ser transferido de plantas para animais via trato gastrointestinal. Ao alcançar o seu sítio de atuação, esta molécula exógena seria capaz de influenciar as condições fisiológicas de seu organismo receptor. Os microRNAs (miR) são moléculas não codificantes, cotadas como sendo capazes de realizar esta ação. São responsáveis por aderirem a moléculas de RNA mensageiros e impedir sua tradução, desta forma regulando vários mecanismos celulares, inclusive o ciclo celular. Este artigo de revisão teve como objetivo montar um panorama das pesquisas neste controverso campo. Conclui-se que, embora sejam necessárias mais pesquisas a respeito para que se possam esclarecer questões relativas ao tema, alguns estudos indicam que os alimentos são capazes de veicular a transferência de miRNAs de um reino ou de uma espécie para outra.

Palavras-chave: Cross-kingdom transfer; MiRNA; Dieta baseada em plantas; XenomiRs.

Abstract

Recently, the academic world has been discussing the theory called “cross-kingdom transfer” in the nutritional scope. It has the idea that bioactive genetic material has the potential to be transferred from plants to animals via the gastrointestinal tract. Upon reaching its site of action, this exogenous molecule would be able to influence the pathophysiological conditions of its recipient organism. MicroRNAs (miR) are molecules listed as capable of carrying out this action. They are responsible for adhering to messenger RNA molecules and preventing their translation, thereby regulating various cellular mechanisms, including cell cycle control. This review article aimed to provide an overview of research in this controversial field. It is concluded that, although more research is needed in order to clarify issues related to the theme, some studies indicate that food can serve to the transfer of miRNAs from one kingdom or from one species to another.

Keywords: Cross-kingdom transfer; MiRNA; Plant-based diet; XenomiRs.

Resumen

Recientemente, el mundo académico ha estado discutiendo la teoría denominada “regulación entre reinos”, en traducción libre “regulación cruzada entre reinos” en el ámbito nutricional. Tiene la idea de que el material genéticobioactivo tiene el potencial de ser transferido de plantas a animales a través del tracto gastrointestinal. Al llegar a su sitio de acción, esta molécula exógena podría influir en las condiciones fisiopatológicas de su organismo receptor. Los microARN (miR) son moléculas enumeradas como capaces de llevar a cabo esta acción. Son los encargados de adherirse a las moléculas de ARN mensajero y prevenir su traducción, regulando así varios mecanismos celulares, incluido el control del ciclo celular. Este artículo de revisión tuvo como objetivo

proporcionar una descripción general de la investigación en este controvertido campo. Se concluye que, si bien se necesitan más investigaciones para esclarecer cuestiones relacionadas con el tema, algunos estudios indican que los alimentos pueden transmitir la transferencia de miARN de un reino o de una especie a otra.

Palabras clave: Transferencia entre reinos; MiARN; Dieta a base de plantas; XenomiRs.

1. Introdução

A recente teoria chamada de “cross-kingdom transfer” implica na ideia de que material genético bioativo, de origem dietética, tem o potencial de ser transferido de plantas, algas e outros seres vivos para animais, via trato gastrointestinal. Ao alcançar o seu sítio de atuação, esta molécula exógena seria capaz de influenciar as condições fisiológicas do organismo receptor. Os miRNAs (miR) são cotados como sendo capazes de realizar esta ação (Li, Xu, & Li, 2018). Os miR são moléculas não codificantes, mas que modulam a síntese de diversas proteínas.

Sabe-se que os miR desempenham papéis fundamentais na regulação de mecanismos homeostáticos e outros processos essenciais, como apoptose e ciclo celular (Friedman, Farh, Burge, & Bartel, 2009). Agem ligando-se a um RNA mensageiro (RNAm) alvo, bloqueando sua tradução ou levando à sua degradação (Peng & Croce, 2016).

No ano de 2012, foi publicado um estudo que identificou a presença de miR de arroz em amostras de sangue humano, dando início ao debate sobre a função que estes miR exógenos (xenomiRs) de origem dietética poderiam desempenhar no organismo humano (Zhang *et al.*, 2012). Até aquele momento, acreditava-se que todo material genético de matriz alimentar fosse degradado ao longo do processo de digestão, não havendo possibilidade de absorção de alguma molécula ativa, somente de seus subprodutos (Witwer, 2012).

Neste artigo de revisão, a partir de pesquisa bibliográfica, iremos transcorrer sobre a teoria de regulação cruzada entre reinos e espécies e a possibilidade de miRs atuarem como moléculas efetoras.

2. Metodologia

Foi realizada uma revisão de natureza bibliográfica com abordagem qualitativa, realizada através da pesquisa de artigos científicos indexados nas bases de dados eletrônicas Pubmed, Web of Science, Scopus e Google Scholar. Os critérios de inclusão foram: artigos com disponibilidade na íntegra, que apresentavam coesão com a temática do estudo em tela, e que relacionam exclusivamente a transferência de miRNA entre os reinos vegetal e animal.

3. Resultados e Discussão

MicroRNAs (miRs) são moléculas de RNA não-codificantes de aproximadamente 23 nucleotídeos de comprimento, responsáveis por regular processos essenciais, como apoptose e ciclo celular. Atuam no processo de tradução, ligando-se ao RNA mensageiro (RNAm) alvo e impedindo a síntese de sua proteína correspondente quando seu encaixe é de baixa complementariedade, ou levando à degradação do RNAm, quando o encaixe é de alta complementariedade (Peng & Croce, 2016).

O primeiro estudo que identificou miR de origem dietética em amostras de sangue de voluntários chineses (Zhang *et al.*, 2012) causou grande controvérsia, não só por afirmar que o organismo humano era capaz de absorver material genético ativo, mas por descrever seu impacto na expressão de genes em mamíferos. Os experimentos

indicaram que o miR168a, de origem vegetal, foi capaz de aumentar a expressão de receptor de lipoproteína no fígado de camundongos.

Entendia-se que DNA e RNAs não seriam capazes de exercer nenhuma ação depois de passarem pelo processo de digestão (Witwer, 2012), contrariamente ao proposto por Zhang e colaboradores (Zhang et al., 2012).

Desde então, muitos trabalhos foram publicados a respeito, corroborando com a teoria de transferência e regulação cruzada, ou negando sua possibilidade. Na Tabela 1, pode-se ver uma síntese dos principais estudos publicados até o momento que investigaram a possibilidade transferência de miRNAs de plantas para animais. Alguns destes estudos investigaram também a capacidade de regulação exercida por estes miRNAs no organismo receptor. Pesquisas sugerem que quantidades significativas deste material genético poderiam continuar ativas, mesmo depois de cocção (Phillip, Ferro, & Tate, 2015) e digestão (Zhang *et al.*, 2012), protegidas por camadas lipídicas e proteínas carreadoras da ação de ácidos e enzimas digestivas.

Tendo em vista a importante mudança de paradigma proposta pelo estudo de Zhang e colaboradores, foram reunidos nesta revisão os resultados dos principais estudos que objetivaram avaliar a transferência de miR de origem vegetal para animais, os quais estão destacados na Tabela 1.

Tabela 1. Alguns estudos sobre a transferência de miRNA entre *plantas e animais* e principais resultados encontrados.

Fonte vegetal	Organismo estudado	Método e Resultados encontrados	Referência
<i>Estudos que detectaram transferência de miRNA</i>			
Arroz (<i>Oriza sativa</i>)	Homem e camundongo	Os autores identificaram miRs exógenos, de plantas, no soro humano e em diversos tecidos de camundongos. O miR168, abundante em arroz, foi um dos xenomiR encontrados com maior abundância no soro de indivíduos chineses. Além de ser transferido para o plasma humano, os autores mostraram que estes miR eram capazes de regular a expressão de RNAm e funções biológicas em camundongos.	Zhang <i>et al</i> 2012
Plantas diversas, não especificadas	Homem e porco	Foram analisados 12 bancos de dados brutos de small RNA (sRNA) de exossomos de leite humano e de porco. Foram identificados 35 miRs de plantas nos exossomos humanos e 17 miRNAs nos exossomos de porco. Por meio de ferramentas de bioinformática, as análises de predição sugerem que as moléculas acima mencionadas podem interagir com RNAm que codificam vários fatores de transcrição, receptores de proteínas, transportadores e proteínas relacionadas ao sistema imunológico, assim potencialmente influenciando o organismo humano. Tomados em conjunto, as análises indicam a ocorrência abundante de miRs de plantas em exossomos de leite materno de mamíferos.	Lukasik <i>et al</i> 2014
Ervas medicinais: madressilva, camomila, acácia do Japão, lavanda, malva azul, ginseng, hibisco, salgueiro	Camundongo	Camundongos foram alimentados por sete dias com dietas suplementadas com ervas. O soro e a urina foram analisados após o período de intervenção, tendo sido detectada a presença abundante do miR2911 em soro dos animais suplementados com todas as ervas, exceto lavanda. Então, os animais receberam o miR2911 sintético por gavagem e foi identificado seu aumento no soro dos animais.	Yang <i>et al</i> 2015
Plantas não especificadas, e madressilva (<i>Lonicera japonica</i>)	Homem e camundongo	Foi identificou a presença de miRs de plantas no cordão umbilical e no líquido amniótico humano, indicando a ocorrência de transferência de miR de origem exógena da mãe para o feto. Considerando a presença abundante do miR2911 na erva medicinal madressilva, camundongos receberam 0,5 mL de uma decocção de madressilva e o plasma materno e fetal foram coletados 3h após a gavagem. Os resultados revelaram que os níveis do miR2911 aumentaram no plasma materno, na placenta e no feto, sugerindo que possa ser transferido eficientemente da placenta para o fígado fetal. Os dados sugerem que miRNAs da dieta possam passar não apenas pelo trato gastrointestinal, mas também pela placenta.	Li <i>et al</i> 2015
Milho (<i>Zea mays</i>)	Porco	Os animais foram alimentados por sete dias com milho fresco. As análises de tecidos e soro revelaram a presença de miRNAs derivados do milho. Além disso, experimentos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> revelaram que miRNAs da dieta com milho eram capazes de atravessar o trato gastrointestinal e entrar na corrente sanguínea suína. Os resultados indicaram que os miRNAs derivados do milho podem ainda regular a expressão de genes suínos.	Luo <i>et al</i> 2017

Fonte vegetal	Organismo estudado	Método e Resultados encontrados	Referência
<i>Estudos que não detectaram transferência de miRNA</i>			
Arroz (<i>Oriza sativa</i>)	Homem, porco, camundongo e insetos	Os autores buscaram por sequências de miRNAs de plantas em bancos de dados públicos de sRNA de vários tecidos de mamíferos. As análises revelaram que miRNAs de plantas estavam presentes nos conjuntos de dados de sRNAs de animais, mas sugerem que estes miRNAs podem se originar no processo de sequenciamento, e que o acúmulo de miRNAs de plantas por via dietética parece não ser universal em animais.	Zhang <i>et al</i> 2012
Arroz (<i>Oriza sativa</i>)	Camundongo	Camundongos foram alimentados com dieta rica em arroz e os resultados não evidenciam a captação de miRNAs de arroz e nem a regulação da síntese de proteínas pelos miRNAs.	Dickinson <i>et al</i> 2013
Azeite - oliveira (<i>Olea europaea</i>)	Homem	Cinco voluntários receberam 40 mL de azeite de oliva extra virgem e o sangue foi analisado para detecção de miRNAs de azeitona (<i>Olea europaea</i>) 2h após a ingestão. Não foi detectada nenhuma quantidade de miRNA de azeite de oliva no plasma humano nestas condições.	Micó <i>et al</i> 2016
Milho (<i>Zea mays</i>)	Camundongo	Camundongos foram alimentados por duas semanas com uma dieta enriquecida com farinha de milho ou com um <i>pool</i> de miRNAs isolados a partir de milho. Usando um modelo de digestão <i>in vitro</i> , identificou-se extensa degradação dos miRNAs, sendo recuperados menos de 1% do total. As análises do sangue e de tecidos revelaram que não houve aumento dos níveis de miRNAs nestes compartimentos após a intervenção.	Huang <i>et al</i> 2018
Frutas (abacate, banana, laranja, maçã e melão) e palem	Homem, camundongo e abelha	Após a ingestão de frutas repletas de microRNAs de plantas (miR156a, miR159a e miR169a), atletas saudáveis não apresentaram quantidades destes miR detectáveis no sangue, assim como os camundongos e as abelhas.	Snow <i>et al</i> 2013
Bebida industrializada à base de soja com frutas (não especificadas)	Macaco	Dois macacos foram alimentados com um shake comercial vegano, à base de frutas. O sangue foi coletado 1h, 4h e 12h após a ingestão. O experimento aponta um número de cópias de miRNA no plasma extremamente baixo. Os autores concluem que os dados não suportam a ideia de que grandes quantidades de miRNAs de plantas entrem na corrente sanguínea.	Witwer <i>et al</i> 2013

Fonte: Autores.

De acordo com a Tabela 1, as fontes de miR vegetal mais estudadas foram: arroz, frutas, madressilva e milho. O arroz foi o alimento mais frequentemente estudado por ser o primeiro a ser documentado como capaz de ser transferido e de exercer atividade biológica no organismo receptor (Zhang et al., 2012). Já as frutas, foram escolhidas por serem componente importante em dietas consideradas saudáveis (Micó et al., 2016). Quanto ao milho, foi utilizado por sua importância nutricional e econômica (Huang, Davis & Wang, 2018). Não só alimentos, mas também ervas medicinais foram pesquisadas.

A madressilva (*Lonicera japonica*), uma planta presente na fitoterapia oriental (Li et al., 2015), foi investigada em dois estudos. Um dos motivos para ser objeto de estudo é a presença expressiva do miRNA2911 (miR2911), um miR documentado como sendo especialmente estável e resistente à cocção (Zhou et al., 2015). Em um dos estudos (Yang et al., 2015), os animais que ingeriram a planta medicinal apresentaram maiores quantidades de miR2911 em amostras de soro e urina.

Alimentos processados foram investigados em dois estudos. No primeiro, listado na Tabela 1 (Micó et al., 2016), foram analisadas amostras de azeite e cerveja, enquanto no segundo (Witwer et al., 2013), foram utilizadas amostras de uma bebida industrializada à base de soja com frutas. Os pesquisadores do primeiro estudo não conseguiram encontrar miR nas amostras dos alimentos, mas o grupo de Witwer conseguiu. Porém, observou-se um número de cópias de miRNA plasmático extremamente baixo. Os autores concluem que os dados não suportam a ideia de que grandes quantidades de miRNAs de plantas sejam absorvidos.

Os artigos apresentados na Tabela 1 levaram em consideração alguns itens que podem alterar o conteúdo de miR nas amostras, tais como as partes do vegetal utilizado (Yang et al., 2015) e o refino do alimento (Micó et al., 2016). Contudo, ainda há uma condição da planta que carece de estudos quanto a absorção de miR: o estágio de desenvolvimento do vegetal.

Considerando-se que os miR desempenham um importante papel no crescimento da planta (Chin et al., 2016), estudos que exploram estas condições ainda precisam ser realizados.

A melhora da biodisponibilidade de uma molécula é influenciada diretamente pela quantidade ingerida: quanto mais se ingere, maior é a chance desta molécula percorrer o trato intestinal em sua forma ativa e ser absorvida pelo organismo (Witwer & Zhang, 2017). Vários mecanismos de absorção de miR foram propostos. Para que o miR de fonte dietética resista em sua forma ativa e seja absorvido pelo epitélio intestinal ele precisaria ser transportado encapsulado em vesículas ou em um complexo ribonucleoproteico. Portanto, a proposição atualmente aceita é que a molécula de miR deixe a matriz alimentar encapsulada, atravesse a barreira epitelial por trânsito paracelular ou transcelular e atinja o sistema linfático ou o circulatório e o miR seja capturado por células M (Chan & Snow, 2017).

Porém, no artigo de Yang et al., 2015, onde os pesquisadores quantificam o miR2911 em várias ervas medicinais, a amostra que obteve o nível mais elevado, acácia japonesa, não foi a que mais influenciou os níveis séricos de miR2911 dos camundongos. Ao invés disso, os camundongos alimentados com madressilva foram os que apresentaram as maiores quantidades de miR2911 circulante. Destacou-se assim a necessidade de se avaliar a resistência da molécula ao longo do trato gastrointestinal e sua biodisponibilidade.

Enquanto o artigo de Huang, Davis e Wang, 2018, indica elevada degradação de miR originário do milho ao longo do processo digestório, um outro artigo que quantificou os níveis de miR em grãos de soja e arroz, tanto na estocagem, no preparo e em um simulacro do processo digestório, evidenciou que ainda existe quantidade significativa destas moléculas para serem supostamente absorvidas (Phillip, Ferro, & Tate, 2015).

Talvez essa diferença entre os estudos se deva provavelmente aos métodos empregados. Enquanto um submeteu a amostra de milho a uma simulação de digestão gástrica de duas horas (Huang, Davis, & Wang, 2018), outro utilizou um protocolo de 1 hora de digestão apenas (Phillip, Ferro, & Tate, 2015). Outro fator relevante são as amostras de grãos diferentes: o primeiro utilizou amostras de milho fresco e o segundo amostras de soja e arroz cozidos.

Outro ponto importante quanto à biodisponibilidade é a viabilidade de se conseguir quantidades de miR ativo o suficiente – por via oral - para causar impacto em um organismo grande e complexo como o humano (Chan & Snow, 2017). Existem estimativas que corroboram a hipótese de ser viável (Chin *et al.*, 2016) e outras que não (Snow *et al.*, 2013).

Um estudo que analisou a ação do miR159 em células de câncer de mama (Chin *et al.*, 2016), constatou que os níveis deste miR, encontrado em uma amostra de pool sérico de voluntários, seria próximo dos níveis de miR159 séricos de amostras provenientes de camundongos alimentados com o miR, quando calculado adaptando-se a área de superfície dos organismos. Os autores também consideram a possibilidade de alguns tecidos acumularem o miR até o nível de relevância biológica.

Já o artigo de Snow *et al.*, 2013, estima que seria necessário que um indivíduo ingerisse, no mínimo, 1,670 Kg de melão cantaloupe para atingir o número necessário de cópias de miR156a no trato gastrointestinal. E como a estimativa de consumo médio de frutas por dia de um europeu fica entre 103-454g, essa proposta não seria viável. Os autores assumem que o conteúdo de miR varia de acordo com o grau de maturação da fruta, porém declaram que a variação documentada não seria o suficiente para atingir a demanda.

Outro ponto que precisa de mais estudos diz respeito à influência da microbiota intestinal. O material genético de origem dietética, ao passar pelo trato digestório, sofre a ação de enzimas responsáveis pela clivagem destas moléculas, tais como fosfatases e nucleosidases. Elas promovem a quebra de nucleotídeos em nucleosídeos e bases purínicas. Essas micromoléculas são absorvidas pelos enterócitos e utilizadas pelo organismo humano (Witwer & Zhang, 2017).

Esse mesmo material pode ser absorvido pelos microrganismos que compõem a microbiota humana. Estudos apontam que nucleotídeos de fonte alimentar podem promover o crescimento de bactérias benéficas presentes na microbiota intestinal, como *Bifidobacterium*. Logo, é esperado que uma grande presença de material genético de origem dietética cause impacto na microbiota. Entretanto, ainda não são claros os efeitos e se eles decorrem da transferência de material genético dos alimentos para as bactérias intestinais ou se resultam de sua utilização como substrato para o crescimento de bactérias intestinais (Witwer & Zhang, 2017).

Yang *et al.*, 2015, relataram um aumento importante no número de colônias nas amostras fecais de camundongos alimentados com madressilva em comparação com o grupo controle. Mas os pesquisadores concluíram que esse efeito foi causado pela erva medicinal, e não pelo miR2911, pois o grupo alimentado com a forma sintética obteve os mesmos resultados quanto a microbiota do grupo controle. Ainda neste estudo, os autores concluíram que a microbiota não influenciava na absorção do miR, dado que os níveis séricos camundongos alimentados com miR sintético foram próximos do grupo alimentado com madressilva.

4. Considerações Finais

Pode-se concluir, diante do que foi apresentado, que este novo campo de estudos permanece inconcluso, carecendo de mais pesquisas a respeito, principalmente que possam esclarecer o suposto mecanismo de absorção de miR e também seus mecanismos de ação no organismo receptor.

É patente que a adoção de um padrão de nutrição adequado e saudável é indispensável na promoção da saúde e a prevenção de doenças. Sabe-se também que a dieta tem influência direta na atividade metabólica e na composição da microbiota intestinal, refletindo diretamente sobre as respostas imune, inflamatórias, entre outras, com consequências para a saúde. Entre as principais recomendações para dieta equilibrada cita-se o consumo regular de frutas e hortaliças. A pergunta

central aqui é se, além dos vários macros, micronutrientes e fitoquímicos presentes nessas matrizes – e sabidamente bioativos - se também existe a transferência de miRs ao consumir tais alimentos e se estes também têm um papel ativo na dieta. Logo, compreender melhor a teoria de regulação cruzada entre reinos e espécies pode trazer à luz a possibilidade de miRs atuarem de fato como moléculas efetoras de origem dietética e visa contribuir para a otimização/personalização de dietas para modulação de questões bioquímicas/fisiológicas específicas, além de ajudar a entender melhor a complexa relação entre os diferentes sistemas biológicos.

Sugerem-se, para trabalhos futuros, estudos que se debrucem sobre o desenvolvimento e validação de métodos analíticos, bem como outras técnicas de preparação de amostras para a detecção destes miRs. Pesquisas como essa são essenciais para aumentar a compreensão sobre o tema. Em adição, estudos mais aprofundados que abordem o tipo de dieta e quantidade de alimento alvo ingerido, e que busquem compreender a interação – e se é que há - dos miRs com microbiota intestinal também são fundamentais.

REFERÊNCIAS

Barampama, Z., & Simard, R. E. (1994). Oligossaccharides, antinutritional factors, and protein digestibility of dry beans as effect processing. *Journal Food Science*, 59(4), 833-838.

Chan, S. Y., & Snow, J. W. (2017). Formidable challenges to the notion of biologically important roles for dietary small RNAs in ingesting mammals. *Genes & Nutrition*, 12(13), <https://doi.org/10.1186/s12263-017-0561-7>.

Chin, A. R., Fong, M. Y., Somlo, G., Wu, J., Swiderski, P., Wu, X., & Wang, S. E. (2016). Cross-kingdom inhibition of breast cancer growth by plant miR159. *Cell Research*, 26(2), 217-228.

Dang, P. M., & Chen, Y. C. (2013). Modified method for combined DNA and RNA isolation from peanut and others oil seeds. *Molecular Biology Report*, 40, 1563-1568.

Dickinson, B., Zhang, Y., Petrick, J.S., Heck, G., Ivashuta, S., & Marshall, W.S. (2013). Lack of detectable oral bioavailability of plant microRNAs after feeding in mice. *Nature Biotechnology* 31(11):965-967. 10.1038/nbt.2737.

Friedman, R. C.; Farh, K. K.-H.; Burge, C. B.; & Bartel, D. P. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1), 92-105.

Gong, C., Tian, J., Wang, Z., Gao, Y., Wu, X., Ding, X., Qiang, Li, G., Han, Z., Yaun, Y., & Gao, S. (2019). Functional exosome-mediated co-delivery of doxorubicin and hydrophobically modified microRNA 159 for triple-negative breast cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 17(93), <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0526-7>.

Hu, Y. B., Li, C. B., Song, N. Zou, Y., Chen, S. D., Ren, R. J., & Wag, G. (2016). Diagnostic value of microRNA for Alzheimer's Diseases: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8(13), 1-13.

Huang, H., Davis, C. D., & Wang, T. (2018). Extensive Degradation and Low Bioavailability of Orally Consumed Corn miRNAs in Mice. *Nutrients*, 10(2), 215. <https://doi.org/10.3390/nu10020215>

Khokar, S.; & Chauhan, B.M. (1986) Antinutritional factors in Moth Bean (*Vigna aconitifolia*): Varietal differences and effects of methods of domestic processing and cooking. *Journal Food Science*, 51(3), 591-594.

Li, J., Zhang, Y., Li, D., Liu, Y., Chu, D., Jiang, X., Hou, D., Zen, K., & Zhang, C. Y. (2015). Small noncoding RNAs transfer through mammalian placenta and directly regulate fetal gene expression. *Protein and Cell* 63:391-396 [10.1007/s13238-015-0156-2](https://doi.org/10.1007/s13238-015-0156-2).

Li, Z., Xu, R., Li, N. (2018). MicroRNAs from plants to animals, do they define a new Messenger for communication? *Nutrition & Metabolism*, 15 (68)

Lukasik, A., & Zielenkiewicz, P. (2014). In silico identification of plant miRNAs in mammalian breast milk exosomes - a small step forward? *PLOS ONE* 9(6):e99963 DOI [10.1371/journal.pone.0099963](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099963).

Luo, Y., Wang, P., Wang, X., Wang, Y., Mu, Z., Li, Q., Fu, Y., Xiao, J., Li, G., Ma, Y., Gu, Y., Jin, L. M. J., Tang, Q., Jiang, A., Li, X., & Li, M. (2017). Detection of dietetically absorbed maize-derived microRNAs in pigs. *Scientific Reports* 7:645 DOI [10.1038/s41598-017-00488-y](https://doi.org/10.1038/s41598-017-00488-y).

Micó, V., Martín, R., Lasunción, M. A., Ordovás, J. M., & Daimiel, L. (2016). Unsuccessful detection of plant MicroRNAs in Beer, extra virgin olive oil and human plasma after an acute ingestion of extra virgin olive oil. *Plant Foods for Human Nutrition* 71(1):102-108. [10.1007/s11130-016-0534-9](https://doi.org/10.1007/s11130-016-0534-9).

Millar, A. A., & Lohe, A., Wong, G. (2019). Biology and Function of miR159 in plants. *Plants*, 8(8), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6724108/>

Oliveira, M. A. (2012). Brotos de soja: produção, características nutricionais, análise sensorial e processamento. *Brazilian Journal Food Technology*, 16(1), 34-41.

Peng, Y., & Croce, C. M. (2018). The role of microRNAs in human cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 1. Recuperado em: janeiro, 2018, de <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>.

Perge, P., Nagy, Z., Decmann, A., Igaz, I., & Igaz, P. (2017). Potential relevance of microRNAs in inter-species epigenetic communication and implications for disease pathogenesis. *RNA Biology*, 14(4), 391-401.

Philip, A., Ferro, V. A., & Tate, R. (2015). Determination of the potential bioavailability of plant microRNA using a simulated human digestion process. *Molecular Nutrition & Food Research* (59), 1962-1972.

Reyes, J. L., & Chua, N. H. (2007). ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *The Plant Journal*, 49(4), 592-606.

Snow, J.W., Hale, A. E., Isaacs, S. K., Baggish, A. L., & Chan, S. Y. (2013). Ineffective delivery of diet derived microRNAs to recipient animal organisms. *RNA Biology* 10(7):1107-1116 DOI 10.4161/rna.24909

Witwer, K. W. (2012). XenomiRs and miRNA homeostasis in health and disease. *RNA Biology*, 9(9), 1147-1154.

Witwer, K. W., McAlexander, M. A., Queen, S. E., & Adams, R. J. (2013). Real-time quantitative PCR and droplet digital PCR for plant miRNAs in mammalian blood provide little evidence for general uptake of dietary miRNAs: limited evidence for general uptake of dietary plant xenomiRs. *RNA Biology* 10(7):1080-1086. 10.4161/rna.25246.

Witwer, K. W., & Zhang, C. Y. (2017). Diet-derived microRNAs: unicorn or silver bullet? *Genes & Nutrition*, 12(15). <https://doi.org/10.1186/s12263-017-0564-4>.

Yang, J., Farmer, L M., Agyekum, A. A. A., Elbaz-Younes, I., & Hirschi, K. D. (2015). Detection of a abundant plant-based small RNA in healthy consumers. *PLOS ONE* 10(9):e0137516 DOI 10.1371/journal.pone.0137516.

Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., Zhang, Y., Li, J., Bian, Z., Liang, X., Cai, X., Yin, Y., Wang, C., Zhang, T., Zhu, D., Xu, J., Chen, Q., Ba, Y., Liu, J., Wang, Q., Chen, J., Wang, J., Wang, M., Zhang, Q., Zhang, J., Zen, K., & Zhang, C. Y. (2012). Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research*, 22(1), 107-126.

Zhang, Y., Wiggins, B.E., Lawrence, C., Petrick, J., Ivashuta, S., & Heck, G. (2012). Analysis of plant-derived miRNAs in animal small RNA datasets. *BMC Genomics* 13:381. 10.1186/1471-2164-13-3

Zhou, Z., Li, X., Liu, J., Dong, L., Chen, Q., Liu, J., & Kong, H. (2015). Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses. *Cell Research*, 25(1), 39-49.