



Universidade Federal do ABC



Universidade Federal do ABC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS - CCNH**

FLÁVIA MARINHO CORREIA DA SILVA

ANÁLISE *IN SILICO* DE MUDANÇAS DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRO-RNAs DE TECIDO ADIPOSEO BRANCO EPIDIDIMAL DE CAMUNDONGOS DAS LINHAGENS C57BI/6J E FVB/N SUBMETIDOS À DIETA RICA EM GORDURA.

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO | BACH. EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SANTO ANDRÉ – SP

2023

FLÁVIA MARINHO CORREIA DA SILVA

ANÁLISE *IN SILICO* DE MUDANÇAS DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRO-RNAs DE TECIDO ADIPOSEO BRANCO EPIDIDIMAL DE CAMUNDONGOS DAS LINHAGENS C57BI/6J E FVB/N SUBMETIDOS À DIETA RICA EM GORDURA.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina NHT1049-15 Trabalho de Conclusão de Curso em Biologia, do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do ABC – UFABC, como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Profa. MSc. Michelle do Nascimento Sales.

SANTO ANDRÉ – SP

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Marinho Correia da Silva, Flávia
ANÁLISE IN SILICO DE MUDANÇAS DO PERFIL DE
EXPRESSÃO DE MICRO-RNAs DE TECIDO ADIPOSEO
BRANCO EPIDIDIMAL DE CAMUNDONGOS DAS
LINHAGENS C57Bl/6J E FVB/N SUBMETIDOS À DIETA RICA
EM GORDURA. / Flávia Marinho Correia da Silva. — 2023.

52 fls. : il.

Orientadora: Michelle do Nascimento Sales

Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal do
ABC, Bacharelado em Ciências Biológicas, Santo André,
2023.

1. Obesidade. 2. MiRNAs. 3. C57BL/6J. 4. FVB/N. 5.
Mienturnet. I. do Nascimento Sales, Michelle. II. Bacharelado
em Ciências Biológicas, 2023. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Discente aprovada em _____ de _____ de 2023.

Prof. Dr. Alexandre Hiroaki Kihara
Examinador(a) interno(a)

Dra. Érica de Sousa
Examinador(a) externo(a)

Dra. Kelly Annes
Membro suplente

Profa. MSc. Michelle do Nascimento Sales
Orientador(a)

AGRADECIMENTOS

À UFABC por sua existência e excelência, onde encontrei a oportunidade de cursar um curso superior de forma gratuita para que eu pudesse me tornar uma bióloga consciente do meu papel social, compreendendo minha responsabilidade como cientista e me guiando na busca pelo conhecimento e senso crítico.

À minha orientadora, Profa. MSc. Michelle do Nascimento Sales por todo apoio, paciência e dedicação para me guiar nessa trajetória do conhecimento.

À minha família, em especial os meus pais (Miriam e Vagner) que, diferente de mim, não tiveram a oportunidade de iniciar um curso superior como eu e mesmo assim sempre me apoiaram e nunca me deixaram desistir.

Ao Marcelo, meu companheiro que é minha dupla na vida e pai da minha filha, por ser uma inspiração e me apoiar, me acolher nos momentos de ansiedade e medo e me fazer feliz.

À minha filha Olívia, que irá nascer em outubro de 2023 mas já me tornou uma pessoa melhor, mais sensível, humana e madura, me dando forças para eu continuar minhas batalhas profissionais, acadêmicas e pessoais, me fazendo companhia com seus “chutes” e me mostrando que eu não estou sozinha.

Aos meus pets Piqueno (2000-2019), Faísca e Pipito, que me trouxeram muitas alegrias, felicidade, amor incondicional e me ajudaram a manter a saúde mental ao longo da minha jornada, em especial ao longo da pandemia de covid-19.

Ao cursinho comunitário Pimentas, o projeto social que me deu a oportunidade de conhecer o mundo das universidades públicas e trabalhou meu potencial para que eu pudesse ser a primeira pessoa da minha família a ingressar em um curso superior.

Por fim, agradeço todos os amigos (tanto os permanentes, que estão presentes na minha vida até hoje quanto os transitórios, que passaram brevemente pela minha vida, mas me ensinaram lições valiosas), companheiros de bancada no laboratório e docentes como a Profa. Dra. Iraní Ferreira da Silva Gerab (UNIFESP), Prof. Dr. Harki Tanaka (UFABC) e meu primeiro orientador de Iniciação Científica, o Prof. Dr. Alessandro Silva Nascimento (USP) que tiveram a paciência e zelo de conversarem comigo, me acalmando nos momentos de maior ansiedade, me incentivando e me mostrando que eu era capaz de realizar qualquer sonho.

RESUMO

Obesidade é o acúmulo anormal de gordura corporal que eleva o peso do indivíduo, tendo como característica principal a hipertrofia e hiperplasia de adipócitos do tecido adiposo branco (*WAT*), que se apresenta disfuncional em seu papel endócrino. Descobertos na década de 1990, microRNAs (também conhecidos como miRNA) são pequenos RNAs endógenos não-codificantes compostos por 19-23 nucleotídeos que regulam o controle pós-transcricional da expressão gênica de diversos genes, sendo que um único microRNA pode controlar vários genes alvo. Há uma clara relação entre as disfuncionalidades do *WAT* no quadro de obesidade e o perfil de expressão dos microRNAs, levando a alteração da expressão de genes-chave do metabolismo do tecido. O objetivo principal deste projeto é investigar as alterações de expressão de microRNAs do tecido adiposo branco epididimal de camundongos machos das linhagens C57Bl/6J e FVB/N que desenvolveram um quadro de obesidade induzida pela administração de HFD (*high fat diet*). Utilizamos as plataformas *online* MIENTURNET (*MicroRNA Enrichment Turned Network*) e miRNet 2.0, para, a partir da expressão dos genes alvo, prever quais microRNAs estão envolvidos na modulação metabólica do tecido em resposta à dieta rica em gordura. A partir desta análise, identificamos que pela plataforma Mienturnet, 128 miRNAs foram *up*-regulados e 145 foram *down*-regulados na linhagem C57Bl/6J, ao passo que para os animais FVB/N, 145 miRNAs foram *up*-regulados e 143 foram *down*-regulados. Ambos os grupos apresentaram miRNAs exclusivos para cada linhagem e cada perfil de expressão (*up* ou *down*-regulação). Para a plataforma Mirnet, não foi possível realizar a análise para a linhagem FVB. Quando comparados os recursos que cada plataforma fornece, concluímos que a escolha da plataforma deve ser feita de acordo com as necessidades e quantidade de dados submetidos a *upload*.

Palavras-chave: Obesidade; MiRNAs; C57BL/6J; FVB/N; Mienturnet; MiRNet 2.0.

ABSTRACT

Obesity is the abnormal accumulation of body fat that increases the individual's weight, presenting as its main characteristic the hypertrophy and hyperplasia of white adipose tissue adipocytes (WAT), which is dysfunctional in its endocrine role. Discovered in the 1990s, microRNAs (also known as miRNA) are small endogenous non-coding RNAs composed of 19-23 nucleotides that regulate the post-transcriptional control of gene expression of several genes, and a single microRNA can control several target genes. There is a clear relationship between WAT dysfunctionalities in the context of obesity and the microRNAs expression profile, leading to changes in the expression of key genes in tissue metabolism. The main objective of this project is to investigate changes in the expression of microRNAs in the epididymal white adipose tissue of male mice of the C57Bl/6J and FVB/N lineages that developed obesity induced by the administration of HFD (high fat diet). We used the MIENTURNET (MicroRNA Enrichment Turned Network) and miRNet 2.0 online platforms to predict which microRNAs are involved in tissue metabolic modulation in response to a high-fat diet based on the expression of target genes. From this analysis, we identified that by the Mienturnet platform, 128 miRNAs were up-regulated and 145 were down-regulated in the C57Bl/6J lineage, whereas for the FVB/N animals, 145 miRNAs were up-regulated and 143 were down-regulated. Both groups presented unique miRNAs for each lineage and each expression profile (up or down-regulation). For the Mirnet platform, it was not possible to perform the analysis for the FVB line. When comparing the features that each platform provides, we conclude that the choice of platform should be made according to the needs and amount of data uploaded.

Keywords: Obesity; MiRNAs; C57BL/6J; FVB/N; Mienturnet; MiRNet 2.0.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
1.1	ESTILO DE VIDA CONTEMPORÂNEO E OBESIDADE.....	8
1.2	TECIDO ADIPOSE BRANCO E SEU METABOLISMO ENERGÉTICO.....	9
1.3	MICRORNAS: DEFINIÇÃO E BIOGÊNESE	19
1.4	MICRORNAS E O TECIDO ADIPOSE BRANCO	23
2	OBJETIVO.....	28
2.1	OBJETIVO ESPECÍFICO	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1	MIENTURNET	30
4.2	MIRNET	41
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
6	REFERÊNCIAS	48
7	ANEXOS.....	52

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estilo de vida contemporâneo e obesidade

Com os avanços tecnológicos ocorridos na sociedade nos últimos anos (estimulados e impulsionados a partir da Revolução Industrial, iniciada no século XVIII) que tornaram atividades rotineiras muito mais rápidas e práticas de serem executadas, o estilo de vida sedentário tornou-se uma tendência mundial. Como exemplo, as atuais jornadas de trabalho longas e produtivas não seriam possíveis sem o uso dos computadores (e com a nova modalidade de jornada conhecida como *home office*, não é necessário mais sair de casa para trabalhar); comprar alimentos tornou-se uma tarefa que pode ser realizada através de aplicativos, onde é possível agendar uma entrega de supermercado ou comprar a refeição já pronta em redes de *fast food* onde o alimento sequer necessita ser preparado.

O estilo de vida sedentário não acomete apenas os adultos. Apesar de nas duas últimas décadas as crianças passarem menos tempo assistindo televisão, a exposição ao tempo de tela aumentou. Na Austrália, crianças em idade pré-escolar gastam em média 113 minutos/dia utilizando celulares e *tablets*, sendo que o limite máximo recomendado é de 60 minutos/dia. Entre adolescentes que ultrapassavam o tempo de uso desses dispositivos, a chance de desenvolvimento de sobrepeso ou obesidade era 1,8 vezes maior, além da exposição em horários noturnos interferirem na qualidade do sono (7).

As facilidades tecnológicas permitem o desenvolvimento e a manutenção de um estilo de vida mais sedentário (onde menos energia é gasta), acompanhado pelo aumento da ingestão calórica – uma combinação que pode resultar a longo prazo no desenvolvimento de doenças como a obesidade, hipertensão, hipercolesterolemia, doenças coronarianas, diabetes *mellitus* do tipo 2 (T2DM), síndrome metabólica (SM, também conhecida como síndrome X), etc.

De acordo com a OMS - Organização Mundial da Saúde, é possível definir tanto obesidade quanto sobrepeso como o acúmulo anormal de gordura corporal que apresente riscos à saúde e eleva o peso corporal do indivíduo. Ambos têm

se desenvolvido em todo o mundo em proporções pandêmicas (só em 2017, mais de 4 milhões de pessoas morreram por conta de complicações relacionadas à obesidade e sobrepeso) (8). A obesidade com acúmulo de gordura abdominal é ainda mais preocupante, principalmente se acompanhado por resistência insulínica, hipertensão e hiperlipidemia, caracterizando o quadro clínico de SM (9).

O aumento do peso corporal é marcado pelo desequilíbrio homeostático do tecido adiposo que leva ao acúmulo de triglicerídeos (TG, também conhecidos como triacilgliceróis) no tecido adiposo promovendo sua hipertrofia(6) que na maioria das vezes ocorre por conta do desequilíbrio energético, no qual a ingestão calórica diária muitas vezes é maior do que o gasto energético do mesmo período. Além do balanço energético mediado pelo metabolismo, outros fatores como alimentação perinatal, genética, epigenética, metagenômica, privação do sono, distúrbios endócrinos e condições ambientais podem predispor indivíduos a desenvolverem um quadro de obesidade (10).

A obesidade pode ser classificada em 4 principais subtipos (11): obesidade metabólica normal (*MHO*, denominada na literatura também como obesidade metabólica saudável), obesidade metabólica anormal (*MAO*), obesidade metabólica com peso normal (*MONW*) e obesidade sarcopênica (*SO*). Indivíduos acometidos por algum desses subtipos apresentam heterogeneidade fenotípica relacionada a fatores ambientais, sociais, econômicos, celulares, moleculares e genéticos. O anexo I apresenta os subtipos citados, relacionados a seus biomarcadores (11).

1.2. Tecido adiposo branco e seu metabolismo energético

O tecido adiposo é uma variação do tecido conjuntivo que armazena energia na forma de triglicerídeos, composto em sua maioria por adipócitos que podem estar presentes em outros tecidos isoladamente ou formando agregados distribuídos pelo corpo. Além dos adipócitos, o tecido possui preadipócitos (que são adipócitos imaturos), células do sistema imune (macrófagos M1 e, quando recrutados, macrófagos M2, células *NK* e eosinófilos), células do sistema nervoso (o tecido branco é inervado por fibras nervosas sensoriais que formam

redes com áreas metabólicas do cérebro) e células endoteliais e de musculatura lisa (necessárias para vascularização e irrigação do tecido) (12).

Anos atrás o papel metabólico desse tecido era pouco descrito, sendo mais reconhecido por outras funções como por exemplo, sua capacidade de proteção contra choques mecânicos, isolamento térmico, preenchimento de espaço entre outros tecidos e uma reserva energética mais eficiente que o glicogênio (células hepáticas e musculares acumulam energia sob a forma de glicogênio em depósitos menores e que fornecem cerca de 4 kcal/g, ao passo que os triglicerídeos do tecido adiposo fornecem aproximadamente 9 kcal/g) (13).

A classificação atual do tecido também é mais abrangente. Antes, o tecido era comumente classificado como tecido adiposo branco (*WAT*, do inglês *white adipose tissue* - também conhecido como tecido adiposo amarelo ou tecido unilocular, por conter uma única e extensa gotícula lipídica que ocupa quase todo o citoplasma; responsável por reservar energia) e tecido adiposo marrom (*BAT* - *brown adipose tissue* ou tecido multilocular, característico por sua atividade termogênica e por conter grandes quantidades de gotículas lipídicas e mitocôndrias) (13). O *BAT* apresenta como característica uma alta expressão do gene *UCP1* que codifica a termogenina, a proteína desacopladora mitocondrial (2).

Atualmente, a funcionalidade endócrina e heterogeneidade do tecido são mais bem descritas. Em relação ao seu papel endócrino, o tecido adiposo pode ser classificado como branco, marrom, bege (um fenótipo intermediário do *WAT* para o *BAT*), *brite* (*beige or brown-in-white*, um outro tipo de fenótipo transitório de adipócitos que se origina de linhagens *MYF5⁺* e *MYF5⁻* e é encontrado em depósitos de tecido adiposo branco) e rosa, cada qual apresentando diferentes propriedades regulatórias, morfológicas e funcionais por conta da sua composição celular de adipócitos e células do sistema imune. Assim como adipócitos precursores do *BAT* podem se transdiferenciar em adipócitos do tecido adiposo branco ou do tecido adiposo bege, precursores do *WAT* podem se diferenciar em adipócitos do *BAT* ou do tecido adiposo bege. O tecido adiposo rosa é composto por adipócitos rosa que são células alveolares secretoras de leite que, durante a gestação e a amamentação, podem se transdiferenciar a partir de adipócitos brancos (6).

Na obesidade, as células do tecido adiposo aumentam de tamanho (pelo acúmulo de triglicerídeos) e em quantidade, gerando uma disfunção homeostática caracterizada por hipóxia, morte celular de adipócitos e liberação de ácidos graxos livres; essas são resultantes de um quadro inflamatório típico do indivíduo obeso por conta da infiltração excessiva de macrófagos e outras células do sistema imune. A meta-inflamação é iniciada quando os macrófagos residentes do tecido secretam quimiocinas que sinalizam o recrutamento de outros tipos de células imunes que infiltram o tecido adiposo. Adipócitos que sofreram lipólise são circundados por estruturas *CLSs* (do inglês *crown-like-structures*, que são estruturas em forma de coroa) que intensificam o processo inflamatório tecidual, liberam ácidos graxos livres e outras moléculas pró-inflamatórias. Citocinas e quimiocinas são secretadas pelos adipócitos e macrófagos e, dependendo do tipo de citocina liberada, os macrófagos podem ser polarizados em M1 por ação de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ (interferon gama) ou TNF α (fator de necrose tumoral alfa), ao passo que macrófagos M2 são polarizados pelo aumento da expressão de arginase 1 ou pela ação de citocinas anti-inflamatórias como interleucinas IL-4, IL-13 e IL-10 (14).

Metabolismo energético é o processo global presente em sistemas vivos que adquirem e utilizam energia livre necessária para a realização de suas funções biológicas (3) por meio das vias metabólicas, que são uma série de reações enzimáticas consecutivas que ocorrem em etapas resultando em pequenas alterações químicas específicas como remoção, adição ou transferência de elétrons, átomos ou grupos funcionais (2). O metabolismo energético é a resultante de todas as reações bioquímicas (catabólicas e anabólicas) mediadas por enzimas presentes nas vias metabólicas e que ocorrem em uma célula ou em um organismo. No catabolismo, macromoléculas orgânicas (como carboidratos, proteínas e lipídeos, que são maiores e mais complexas) são degradadas em moléculas menores e mais simples, liberando energia; parte dessa energia é empregada na síntese de ATP (Trifosfato de Adenosina) e transportadores de elétrons reduzidos (NADH, NADPH e FADH₂) e outra parte se dissipa em forma de calor. Já no anabolismo, precursores pequenos e simples são empregados na biossíntese de moléculas maiores e mais complexas (como polissacarídeos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos),

sendo necessário fornecer energia para que tais reações ocorram. A energia pode ser fornecida mediante utilização de ATP (transferência de seu grupamento fosfato) ou utilizando o poder redutor dos transportadores de elétrons NADH, NADPH e FADH₂. O ATP é conhecido como “moeda energética” por ser um intermediário químico que, nos organismos vivos, conecta processos celulares entre consumidores e fornecedores de energia ao ser produzido em reações exergônicas e consumido em reações endergônicas, atuando como o elo entre o catabolismo e o anabolismo (2). Esse trabalho apresentará etapas do metabolismo de gorduras a nível de ácidos graxos (AG).

Vertebrados utilizam os ácidos graxos oriundos da dieta ou mobilizam gorduras armazenadas nos adipócitos ou do fígado, onde o excesso de carboidratos consumidos da dieta é convertido em gordura e exportado para outros tecidos. Quando a célula possui um excedente do aporte energético, ocorre a biossíntese de lipídeos onde os ácidos graxos são convertidos em triglicerídeos. Triglicerídeos são compostos por 3 ácidos graxos unidos a uma molécula de glicerol por ligação éster (2). A figura abaixo representa uma molécula de triglicerídeo.

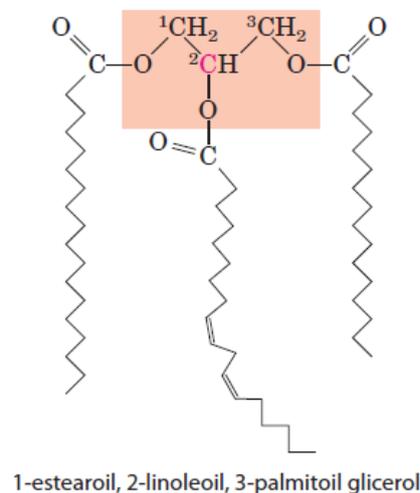
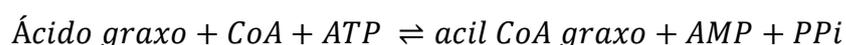


Figura 1. Triglicerídeo misto composto por pelo menos um ácido graxo distinto. No caso do TG representado, os 3 ácidos graxos são distintos. O glicerol já esterificado está destacado em rosa. Extraído de (2).

No catabolismo dos lipídeos para geração de energia, os ácidos graxos precisam ser oxidados. A oxidação completa dos AG a CO₂ e H₂O ocorre em 3 etapas: oxidação dos ácidos graxos a fragmentos de 2 carbonos (acetil-CoA) pela β-oxidação, oxidação do acetil-CoA a CO₂ no ciclo do ácido cítrico e a transferência de elétrons dos transportadores de elétrons reduzidos à cadeia respiratória mitocondrial (2). Contudo, antes de serem oxidados, os AG precisam ser ativados por enzimas tiocinases (também conhecidas como acil-CoA-sintases - ACS) que estão associadas ao retículo endoplasmático ou à membrana mitocondrial externa (3). Os AG são oxidados à acetil-CoA e perdem seus elétrons que passam pela cadeia respiratória para a síntese de ATP. Os ácidos graxos são oxidados por enzimas presentes na matriz mitocondrial, sendo necessário o transporte deles para o interior das mitocôndrias. AG que apresentam mais de 14 carbonos em sua cadeia necessitam passar pelo ciclo da carnitina para atravessarem a membrana mitocondrial. O ciclo possui 3 etapas: esterificação utilizando coenzima A (CoA), transesterificação com carnitina e transporte e transesterificação de volta a CoA. Na primeira reação, as isoenzimas ACS catalisam a formação de uma ligação tioéster entre o grupo carboxil do ácido graxo e o grupo tiol da coenzima A, produzindo um acil-CoA-graxo com a clivagem de um ATP em AMP e PP_i (pirofosfato). A reação geral é apresentada na equação abaixo e os detalhes dessa reação podem ser vistos no anexo II (2).



Os ésteres de acil-CoA-graxo são formados na face citosólica da membrana mitocondrial externa, sendo transportados para o interior da organela e oxidados produzindo ATP (caso não permaneçam no citosol para síntese de lipídeos de membrana). Quando oxidados na mitocôndria, os AG se ligam transitoriamente à hidroxila da carnitina, formando o éster acil-graxo-carnitina (segunda reação), uma transesterificação catalisada na membrana externa pela carnitina acil-transferase I; o éster formado no espaço intermembranoso entra na matriz mitocondrial pelo transportador acil-carnitina/carnitina por difusão facilitada. Na terceira etapa, a isoenzima carnitina-aciltransferase II presente na face citosólica da membrana mitocondrial interna transfere o grupo acil-graxo da

carnitina para a coenzima A intramitocondrial, regenerando a acil-CoA-graxo, liberando-a dentro da matriz. A carnitina também é liberada, retornando ao espaço intermembranoso da mitocôndria pela ação do transportador acil-carnitina/carnitina (2). A figura abaixo ilustra de maneira simplificada as etapas do ciclo da carnitina.

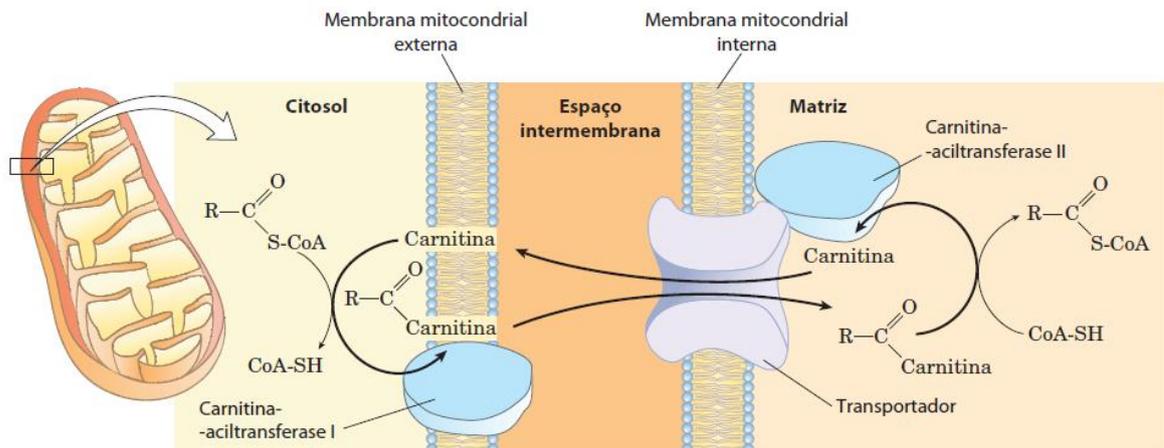


Figura 2. Entrada de ácido graxo na mitocôndria pelo ciclo da carnitina.

Além da mitocôndria, a β -oxidação ocorre também nos peroxissomos (15). Contudo, a β -oxidação mitocondrial e peroxissômica difere em alguns aspectos. Em animais, a β -oxidação peroxissômica encurta longas cadeias de ácidos graxos, o que facilita a continuidade da degradação desses AG pela β -oxidação mitocondrial. A proteína ALD é um transportador ABC que transporta os ácidos graxos de cadeia muito longa para dentro dos peroxissomos sem a necessidade da carnitina e, uma vez no interior da organela, essas cadeias são ativadas por uma ACS de cadeia longa para formar ésteres de CoA que são oxidados diretamente. Com isso, as acil-CoA que tiverem suas cadeias encurtadas pela β -oxidação se ligam à carnitina para serem transportadas para as mitocôndrias, onde sofrem oxidação (3). A β -oxidação é assim conhecida porque para superar a estabilidade das ligações entre os carbonos dos ácidos graxos, o grupo carboxil do primeiro carbono é ativado pela ligação à coenzima A, permitindo a oxidação gradual do grupo acil graxo na posição do C₃ (ou β), originando o nome β -oxidação (2).

Para ácidos graxos saturados, a β -oxidação ocorre em 4 etapas, catalisadas pelas enzimas acil-CoA-desidrogenase, enoil-coA-hidratase, 3-hidroxi-acil-CoA-desidrogenase e 3-cetoacil-CoA-tiolase (uma tiolase) (15). Na primeira etapa, a desidrogenação da acil-Coa-graxo gera uma dupla ligação entre os carbonos α e β denominada *trans*- Δ^2 -enoil-CoA, gerando uma configuração *trans* e tendo o FAD como acceptor final de elétrons. Na etapa seguinte, água é adicionada à dupla ligação formando o estereoisômero L da β -hidroxiacil-CoA, que é desidrogenado na terceira etapa formando β -cetoacil-CoA, tendo NAD^+ como acceptor final de elétrons. Por fim, na quarta etapa da β -oxidação, a tiolase separa o fragmento de dois carbonos da extremidade carboxílica do ácido graxo, que se une a uma coenzima A livre formando acetil-CoA. Essas quatro etapas se repetem, sempre produzindo acetil-CoA e ATP (2). O anexo III (2) exemplifica a via da β -oxidação utilizando o palmitato, que participa da via como palmitoil-CoA, a forma ativada do palmitato.

Em condições de jejum prolongado, gliconeogênese consome os intermediários do ciclo do ácido cítrico e o acetil-CoA produzido no fígado durante a oxidação dos AG pode ser convertido a corpos cetônicos e exportado para outros tecidos. Produzidos na matriz mitocondrial de células hepáticas, os corpos cetônicos (acetona, acetoacetato e D- β -hidroxibutirato) são solúveis no sangue e na urina, sendo esses dois últimos transportados para outros tecidos onde são convertidos em acetil-CoA e oxidados no ciclo do ácido cítrico para fornecer energia. Para a produção de acetoacetato, 2 moléculas de acetil-CoA se condensam em uma molécula de acetoacetil-CoA por ação da tiolase. Mais um acetil-CoA se condensa ao acetoacetil-CoA, formando β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que é clivado a acetoacetato e acetil-CoA; por ação enzimática, o acetoacetato pode ser convertido tanto em acetona quanto em D- β -hidroxibutirato (2). O anexo IV (2) mostra essa conversão e as enzimas envolvidas no processo.

Em condições normais, pequenas quantidades de acetona é produzida a partir de acetoacetato. Contudo, em pacientes com diabetes mellitus não tratado, os corpos cetônicos se acumulam de maneira tóxica. O pH do sangue diminui por contas dos elevados níveis de acetoacetato e D- β -hidroxibutirato, uma condição típica do quadro de acidose que pode levar o paciente ao coma ou à morte (2).

No anabolismo dos AG, um pensamento errôneo pode surgir e se mostrar irresistivelmente intuitivo: a biossíntese não é simplesmente a ocorrência das reações inversas do catabolismo. Por exemplo, a malonil-CoA é um intermediário da via que não participa do catabolismo. A enzima acetil-CoA-carboxilase (ACC) catalisa a formação de malonil-CoA a partir de acetil-CoA e HCO_3^- (bicarbonato) em um processo irreversível; essa enzima apresenta a biotina como grupo prostético e possui três regiões funcionais: a proteína carreadora de biotina, a biotina-carboxilase, que ativa CO_2 do bicarbonato ao se ligar a um átomo de nitrogênio no anel da biotina, com gasto de ATP e a transcarboxilase, que transfere CO_2 ativado da biotina para a acetil-CoA, formando a malonil-CoA. As reações são apresentadas com mais detalhes no anexo V (2).

A biossíntese de ácidos graxos ocorre no citosol (ambiente altamente redutor) e conta com processos endergônicos e redutivos (ao contrário do catabolismo, onde os processos são oxidativos), ocorrendo em 4 etapas que serão descritas em breve e, em cada uma das passagens pelo ciclo, dois carbonos (grupamentos acetila) são adicionados à molécula que está sendo produzida. Essas etapas se repetem e são catalisadas pela enzima ácido graxo-sintase (AGS). Por AGS, duas variações são conhecidas: a AGS I (presente em vertebrados e fungos) e a AGS II (encontrada em vegetais e bactérias). Presente no citosol, a AGS I apresenta 7 sítios enzimáticos ativos (KS, MAT, DH, ER, KR, ACP e TE) em domínios separados, onde ocorrem reações distintas; caso todos os sítios de ativação sejam inativados, a síntese de ácidos graxos é reduzida. A proteína ACP transporta grupamentos acila e é de grande importância no processo de síntese. Os sítios do complexo AGS I são apresentados no anexo VI (2).

As 4 etapas da síntese de AG são de condensação, redução do grupo carbonila, desidratação e redução de uma dupla ligação. Na condensação, um grupo acetil se condensa a um grupo malonil por ação da enzima KS do complexo AGS I formando acetoacetil, que se liga à proteína ACP formando o complexo acetoacetil-ACP e liberando uma molécula de CO_2 (o carbono dessa molécula é oriundo do HCO_3^- que a ACC utilizou para formar malonil-CoA). Na segunda etapa, o grupo carbonil (carbono 3 da molécula de acetoacetil-ACP formado na etapa 1) é reduzido por ação da enzima KR formando D- β -hidroxibutiril-ACP, com NADPH como doador de elétrons. Na desidratação, a

enzima DH catalisa a remoção de água dos carbonos C₂ e C₃ do D-β-hidroxi-butiril-ACP, formando uma dupla ligação no produto (*trans*-Δ²-butenoil-ACP) que adquire a configuração *trans*. Na última etapa, a enzima ER catalisa a saturação (redução) da dupla ligação presente na *trans*-Δ²-butenoil-ACP, formando buritil-ACP, com o NADPH sendo novamente o doador de elétrons. Essas 4 etapas são demonstradas no anexo VII (2).

O palmitato (16:0, também conhecido como ácido palmítico) é o precursor de todos os AG de cadeia longa. Quando a molécula em formação atinge o comprimento de 16 carbonos, o produto deixa o ciclo; a molécula de acetil-CoA utilizada para iniciar a síntese apresenta um grupamento carboxil e um grupamento metil que fornecem, respectivamente, os carbonos C₁₅ e C₁₆ do palmitato; os outros carbonos da molécula são oriundos da acetil-CoA via malonil-CoA (2).

A biossíntese utiliza acetil-CoA produzido na mitocôndria pela descarboxilação oxidativa do piruvato, pela oxidação de AG e pelo catabolismo de esqueletos de carbono de aminoácidos. Para cada molécula de acetil-CoA utilizada na biossíntese, dois ATPs são consumidos em reações enzimáticas (2). Quando a demanda de ATP é baixa, acetil-CoA mitocondrial pode ser armazenado na forma de gordura (3). A membrana mitocondrial interna é impermeável a acetil-CoA. Para chegar ao citosol, essa acetil-CoA reage com oxaloacetato para formar citrato, por ação da enzima citrato-sintase e por meio do transportador de citrato, o citrato atravessa a membrana e chega ao citosol.

Na biossíntese, o NADPH atua como transportador de elétrons e está presente no citoplasma de hepatócitos e adipócitos, sendo gerado pela via das pentoses-fosfato e pelo malato citoplasmático que, por ação da enzima málica, converte o malato a piruvato. O piruvato retorna à matriz mitocondrial pelo transportador de piruvato presente na membrana mitocondrial interna, onde é convertido a oxaloacetato pela enzima piruvato-carboxilase (2). Os detalhes de todas essas transformações são elucidados no anexo VIII (2). Na mitocôndria e no retículo endoplasmático liso, o sistema de alongamento de ácidos graxos conta com enzimas alongases (para produção de ácidos graxos saturados) e dessaturases (para ácidos graxos insaturados) que aumentam o AG em formação pela adição de grupos acetil (2, 3). Quando a energia disponível é mais do que suficiente para suprir as necessidades metabólicas da célula ou do

organismo como um todo, esse excedente é convertido em AG e estocado na forma de triglicerídeos. A biossíntese de ácidos graxos pode ser regulada por fator limitante ou por expressão gênica. A enzima ACC é um fator limitante pois pode sofrer regulação alostérica ou modificação covalente. Quando a quantidade de acetil-CoA e o ATP mitocondrial aumentam, citrato é transportado para o citosol gerando acetil-CoA ou atuando como um sinal alostérico para ativação da ACC, ao mesmo tempo que inibe a ação da enzima fosfofrutoquinase-1 (PFK-1), reduzindo o fluxo de carbono para a glicólise. Dessa forma, o citrato sinaliza para a célula que suas necessidades energéticas estão sendo supridas. Na modificação covalente, ACC é fosforilada pelos hormônios glucagon e adrenalina e, uma vez fosforilada, torna-se inativa e insensível à ativação por citrato, reduzindo a velocidade de síntese de AG. A regulação da biossíntese pela expressão gênica será citada neste trabalho posteriormente, na seção 1.4. A figura seguinte compara diferenças entre as vias de anabolismo e catabolismo dos ácidos graxos (3).

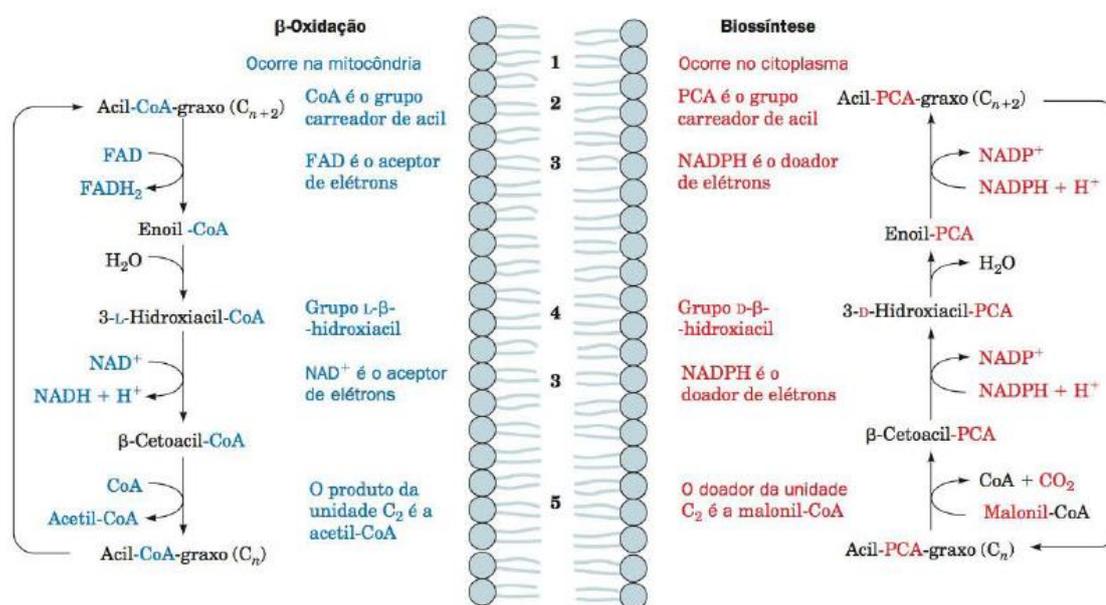


Figura 3. Comparação entre a β-oxidação e a biossíntese de ácidos graxos. É possível notar as diferenças na localização celular (1), no carreador de grupo acil (2), no aceptor ou doador de elétrons (3), na estereoquímica das reações de hidratação e desidratação (4) e na maneira em que unidades C₂ são produzidas ou doadas (5) (3).

1.3. MicroRNAs: definição e biogênese

De acordo com o dogma central da biologia molecular, para que as informações contidas no DNA possam ser utilizadas originando as proteínas, o DNA é transcrito em mRNA (RNA mensageiro, um RNA codificador) que, por sua vez, é traduzido em proteínas. O processo em si é complexo e regulado em várias etapas mas, a grosso modo, é importante ressaltar que a dupla fita de DNA é desespiralizada em uma pequena região, expondo suas bases; uma dessas fitas servirá como um molde para a síntese da molécula de mRNA por ação de RNA polimerases, que são enzimas que realizam a transcrição ao adicionar à fita molde de DNA ribonucleotídeos que pareiam com as bases nitrogenadas do molde por complementaridade. O transcrito se destaca do molde, sofre alterações ainda no núcleo (adição quepe na extremidade 5', adição de uma sequência poli-A na extremidade 3', *splicing*) e é exportado para o citosol, seu códon é reconhecido pelo anticódon contido em uma das extremidades do tRNA (RNA transportador) e, a extremidade 3' do tRNA apresenta um aminoácido ligado. Por fim, a tradução é a utilização da informação contida no RNA para a síntese proteica. Cada códon do mRNA é específico para um aminoácido (lembrando que os aminoácidos são as unidades fundamentais das proteínas) e essa leitura da fita de mRNA em eucariotos é feita pelos ribossomos, que apresentam sítios de ligação específicos para mRNA e tRNA e a partir dessa leitura, os aminoácidos se unem por ligações peptídicas, originando as proteínas. Apesar do mRNA ser um RNA codificante, outros RNAs presentes na células podem ser considerados como não-codificantes(1).

Descobertos na década de 1990 e presentes em eucariotos, os microRNAs (também conhecidos na literatura como miRNAs) são pequenos RNAs não-codificantes (*ncRNAs*) de natureza endógena (4) compostos de 19 à 23 nucleotídeos que realizam um controle pós-transcricional da expressão gênica ao se ligarem à extremidade 3'-UTR, à sequências codificadoras ou à região 5'-UTR de mRNAs-alvo, bloqueando ou inibindo sua tradução (16) ou promovendo sua degradação (1) antes que a tradução seja realizada. O primeiro microRNA descoberto foi o lin-4, identificado no nematoide *C. elegans* e associado ao controle do padrão de desenvolvimento temporal do estágio larval, isto é, animais com mutações de perda de função do gene lin-4 não

desenvolviam algumas estruturas típicas da fase adulta e eram incapazes de botar ovos. Além de regular vários processos biológicos como a apoptose, proliferação, diferenciação e metástase (16), os microRNAs influenciam funções metabólicas e o desenvolvimento, proliferação e diferenciação de adipócitos (6).

Após ser maturado e exportado para o citoplasma celular para o processo de tradução, o mRNA de eucariotos pode ser degradado ou desestabilizado de duas maneiras que comumente ocorrem simultaneamente: pela remoção do quepe 5' (*decapping*) ou pelo encurtamento gradual da cauda poli-A na extremidade 3' até que a sequência codificante seja atingida (1). A figura a seguir apresenta essa degradação de maneira simplificada.

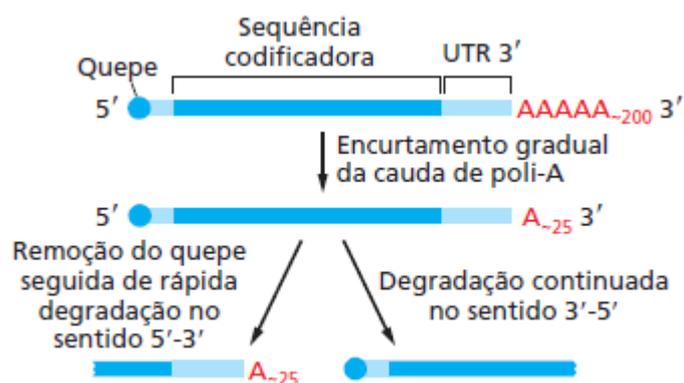


Figura 4. Decaimento do mRNA em eucariotos pela remoção do quepe 5' e encurtamento da cauda poli-A (1).

Os genes que codificam os precursores dos microRNAs são transcritos no interior do núcleo de células eucarióticas pela RNA polimerase II (RNAPII) e, inicialmente, esses transcritos apresentam um tamanho maior e conformação de fita dupla (*dsRNA*, do inglês *double – stranded RNA*), denominados pri-miRNAs, que são microRNAs primários que sofrem diversas modificações ainda no núcleo até serem maturados e exportados para o citosol; a primeira modificação é a clivagem do pri-miRNA pelo complexo proteico Drosha/*DiGeorge Syndrome Critical Region 8 protein* (DGCR8) – sendo Drosha uma RNase III e DGCR8 uma proteína que possui um sítio de ligação para dsRNA – originando o pré-miRNA

(microRNA precursor). Além da dupla fita, o pré-miRNA possui um *loop* de fita simples, formando uma estrutura conhecida como *hairpin*. O transporte do pré-miRNA do núcleo para o citosol se dá pelo complexo nuclear Ran/GTP/exportina-5 (XPO5). Uma vez exportado, o pré-miRNA é clivado pela RNase III denominada *Dicer* e adquire a conformação convencional de até 23 nucleotídeos, sendo agora considerado um microRNA maduro (17).

O complexo proteico *RISC* (do inglês *RNA-induced silencing complex*) é formado pelas proteínas *Dicer*, TRBP (*transactivating response RNA-binding protein*), PACT (*Kinase R-activating proteine*) e AGO2 (*Argonaute 2*) (18) e conduz o microRNA pelo citoplasma. Ao se ligar a este complexo, o microRNA maduro forma o complexo RISC-miRNA (miRISC), muda sua conformação de *dsRNA* para *ssRNA* (*single – stranded RNA*) pela ação da proteína PIWI, que atua como endonuclease clivando o microRNA. A proteína PIWI é um dos quatro importantes domínios da proteína AGO2, sendo os demais domínios conhecidos como N-terminal, PAZ e MID; os domínios PAZ e MID se ligam ao microRNA em suas porções 3' e 5', respectivamente (18). A figura a seguir mostra com detalhes os domínios da AGO2.

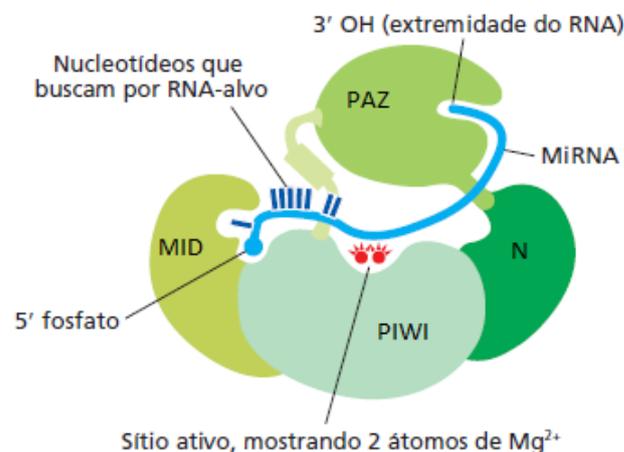


Figura 5. Proteína AGO2 humana e seus 4 domínios, complexada a um microRNA. Adaptada de (1).

O complexo miRISC é guiado pela fita simples de microRNA até o RNA mensageiro-alvo pelo pareamento de bases. Em plantas esse pareamento é extenso e nesse caso, a proteína AGO2 remove a cauda poli-A expondo-a à ação de exonucleases; em humanos esse pareamento é menos extenso, AGO2 encaminha o mRNA até os corpos P (também conhecidos como corpos de processamento, são agregados de proteínas - com regiões de baixa complexidade - e ácidos nucleicos, encontrados no citosol que impedem a tradução removendo o quepe 5' e encurtando a cauda poli-A, degradando o mRNA (1). A figura a seguir mostra a biogênese de microRNA e seu direcionamento até o transcrito, de maneira resumida.

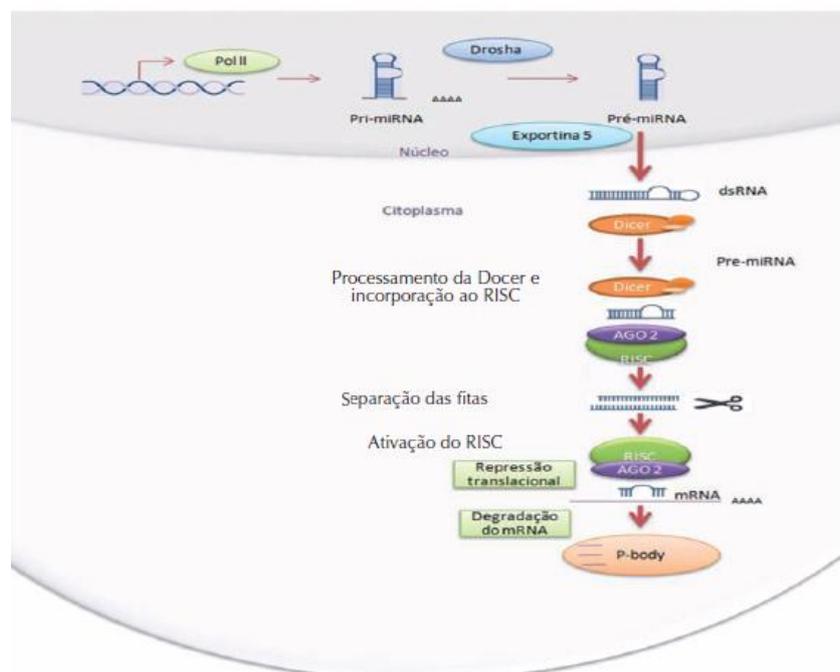


Figura 6. Biogênese simplificada de microRNA e seu direcionamento até mRNA-alvo. Adaptada de (4).

Além de estar associado a outras doenças como T2DM, câncer e cardiopatias, a obesidade é considerada uma doença inflamatória crônica na qual o tecido adiposo apresenta polarização e infiltração de macrófagos e de outras células do sistema imune (que contribuem para a morte celular dos

adipócitos e liberação de ácidos graxos, citocinas e quimiocinas) resultando em hipóxia, morte celular e alteração na diferenciação de preadipócitos.

1.4. MicroRNAs e tecido adiposo branco

Adipócitos são células metabolicamente ativas, respondem a estímulos hormonais em uma interação metabólica com o fígado e a musculatura esquelética, além de apresentarem um metabolismo glicolítico ativo. Em períodos de alta captação de carboidratos, o *WAT* converte a glicose em ácidos graxos que originam triglicerídeos. Esses TG armazenados nos adipócitos vêm do fígado (transportados pela corrente sanguínea na forma de *VLDL* – do inglês *very low density lipoprotein*) e do trato intestinal (transportados por quilomícrons) após a ingestão de refeições ricas em gordura. Quando o organismo necessita de energia, as lipases dos adipócitos degradam os TG liberando os ácidos graxos que são transportados na corrente sanguínea até seu tecido-alvo (músculo esquelético, por exemplo) (2).

O nível homeostático da glicose na corrente sanguínea está entre 4,5 à 5,0 mM (2). Como citado na seção 1.2 deste trabalho, hormônios como a insulina, glucagon, adrenalina e cortisol participam da manutenção homeostática da glicemia e do metabolismo energético, controlando processos que acontecem nos tecidos hepático, muscular esquelético e adiposo. A insulina e o glucagon são produzidos no pâncreas e possuem ação antagônica, ou seja, quando os níveis de glicose no sangue caem abaixo da concentração homeostática, o glucagon sinaliza para os tecidos que o glicogênio (via gliconeogênese) e TG (por oxidação) devem ser degradados. Porém, quando os níveis de glicose excedem muito a concentração homeostática, insulina é liberada e sinaliza para esses tecidos que a glicose excedente deve ser captada e armazenada na forma de glicogênio e TG (2). Outros hormônios como a leptina, adiponectina e grelina também desempenham papel importante no metabolismo do *WAT*. A leptina é um tipo de adipocina liberada pelo tecido adiposo que atua nos receptores hipotalâmicos do cérebro sinalizando que as reservas de gordura são suficientes, reduzindo a captação de combustível e aumentando o gasto energético, controlando o apetite. A adiponectina é um hormônio peptídico

produzido no tecido adiposo que sensibiliza outros órgãos para os efeitos da insulina e inibe respostas inflamatórias. Ao circular pela corrente sanguínea, aumenta a captação de AG pelos miócitos, aumenta as taxas de β -oxidação, bloqueia a síntese de AG e gliconeogênese nos hepatócitos e estimula a captação de glicose pelo fígado e músculo. Por fim, a grelina é um hormônio peptídico produzido por células que revestem o estômago; atua na hipófise, no hipotálamo e tecido adiposo e é conhecido por ser um estimulante do apetite (2).

Assim como os hormônios, certos receptores são fundamentais no metabolismo do tecido adiposo e nesse contexto, vale ressaltar duas famílias de receptores: GLUTs e PPARs. A tabela apresentada no anexo IX cita os 12 transportadores da família GLUT (2). Dentre a família de receptores GLUT, o GLUT4 é o transportador de glicose expresso no músculo cardíaco, esquelético e tecido adiposo; quando a concentração de glicose sanguínea se encontra aumentada, por ação da insulina, o GLUT4 aumenta a captação de glicose pelos músculos e pelo *WAT*. O GLUT4 é expresso pelo gene *Slc2a4* (19); na obesidade associada à resistência insulínica, o gene *Slc2a4* é reprimido e a expressão de GLUT4 no tecido adiposo diminui (20). Já na família PPAR (do inglês *peroxisome proliferator activated receptor*) de receptores nucleares temos PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ ; são fatores de transcrição que agem no núcleo ao se ligarem com outro receptor nuclear, o RXR (*retinoid X receptor*) ligando-se a regiões reguladoras do DNA alterando a transcrição de genes (2). Dessa família, o destaque no metabolismo do tecido adiposo é o receptor PPAR γ que é expresso no fígado, *BAT* e *WAT* e regula a sensibilidade de vários tecidos à insulina e o armazenamento de lipídeos (2). Existem 3 isoformas de PPAR γ : PPAR γ 1, PPAR γ 2 e PPAR γ 3; diferente das outras isoformas, a PPAR γ 2 é expressa no tecido adiposo e é regulada em resposta a ingestão de nutrientes e à obesidade (21).

Dependendo do estímulo, o tecido adiposo pode se diferenciar em *WAT* ou *BAT* e ambos são distribuídos de maneira distinta no corpo. Os adipócitos do *BAT* dissipam energia na forma de calor ao sofrerem estimulação β -adrenérgica num processo mediado pela *UCP1* (*uncoupling protein 1*), uma proteína presente na membrana mitocondrial interna que desacopla a força próton-motriz da cadeia respiratória, gastando energia na forma de calor. A distribuição anatômica dos adipócitos ao longo do corpo formando depósitos de gordura difere entre os

animais; dependendo da localização da concentração da massa de gordura, a resposta a determinados estímulos como a mudanças na dieta ou ativação hormonal pode mudar (5). Em humanos, o *WAT* pode ser classificado em duas principais categorias: tecido adiposo subcutâneo (*scAT*) e tecido adiposo visceral (*VAT*), cada qual com funções distintas. O *scAT* representa o maior percentual de massa corporal de gordura, concentrando-se na parede abdominal e nas regiões do fêmur e glúteos, ao passo que o *VAT* corresponde a um percentual menor da massa corporal total de gordura, se concentrando na região intra-abdominal (mesentérica e omental), circundando órgãos como os rins, fígado e coração. Contudo, em camundongos, a distribuição do *WAT* é diferente. No animal, o *VAT* corresponderia ao *WAT* encontrado nas regiões do tríceps, cardíaca, perigonadal (epididimal em machos, abreviado como epiWAT) e perirenal, enquanto o *scAT* nesses animais corresponde ao *WAT* encontrado na região anterior, interescapular e inguinal (14). A figura a seguir mostra a distribuição dessas categorias de *WAT* em humanos e camundongos (5).

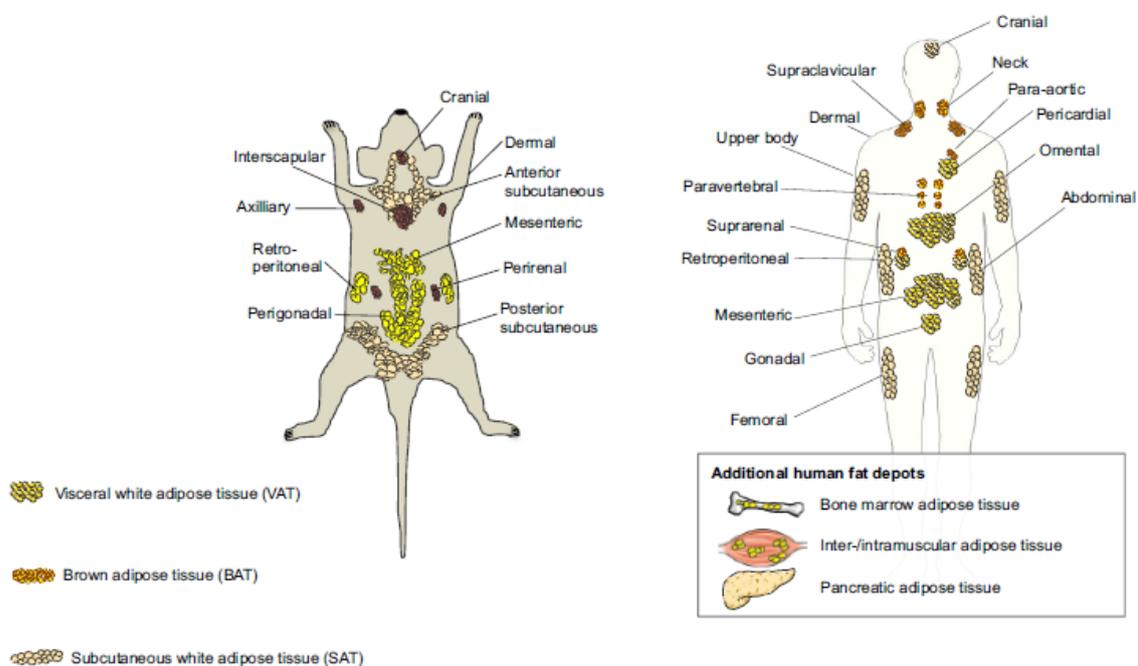


Figura 7. Depósitos de tecido adiposo em humanos e camundongos. De acordo com a distribuição e tipo de tecido, as funções metabólicas e biomarcação são diferentes. Adaptado de (5).

MicroRNAs possuem um papel fundamental no desenvolvimento de síndrome metabólica, homeostase da glicose e progressão da obesidade ao influenciar o fenótipo e função dos adipócitos do *WAT* e *BAT*, ativando ou inibindo a adipogênese, interferindo na diferenciação de adipócitos e sendo considerados como biomarcadores e possíveis alvos terapêuticos na prevenção e no tratamento da obesidade (14). Adipócitos e macrófagos do tecido adiposo secretam microRNAs e a própria polarização dos macrófagos nos fenótipos M1 e M2 podem ser regulados por microRNAs. Por exemplo, o aumento da expressão (*upregulation*) de microRNAs como miR-181-a, miR-155-5p e miR-451 estimulam o surgimento do fenótipo M1, contribuindo para o perfil inflamatório (curiosamente, em camundongos obesos, o fenótipo M1 mostrou-se mais abundante no tecido adiposo e em camundongos magros, a predominância são de macrófagos M2). Contudo, a diminuição da expressão (*downregulation*) de certos microRNAs também contribuem para o perfil de inflamação do tecido adiposo. Em camundongos submetidos a uma dieta rica em gordura de indução à obesidade, a expressão reduzida de miR-30 foi acompanhada pela sinalização de Notch1 e surgimento de macrófagos com fenótipo M1 (14). A figura a seguir ilustra o perfil do tecido adiposo de um camundongo magro um obeso, bem como alguns microRNAs secretados e alguns de seus genes-alvo.

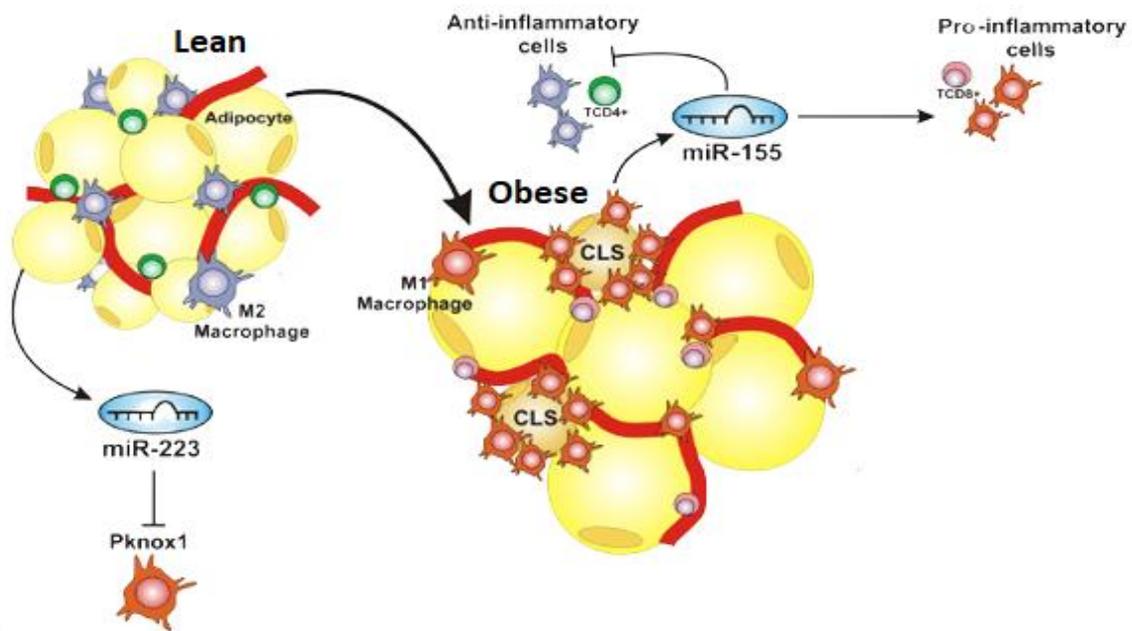


Figura 8. Tecido adiposo branco de camundongo em processo de transição de magro para obeso (note a hipertrofia dos adipócitos, aumento do aporte sanguíneo, recrutamento de células pró-inflamatórias e formação das CLSs). No tecido adiposo do camundongo magro, miR-223 é sintetizado e secretado, suprimindo o gene Pknox1 (*PBX/Knotted 1 Homeobox 1*) que inibe a ativação de macrófagos M1. Já no tecido do camundongo que desenvolveu obesidade induzida por dieta rica em gordura, a secreção de miR-155 estimula a ativação de uma resposta inflamatória. Adaptado de (6).

Os microRNAs são fundamentais na regulação, diferenciação e função dos adipócitos. Devido ao seu papel de armazenamento energético, quando a necessidade de estocar energia aumenta, os pré-adipócitos do *WAT* se diferenciam em adipócitos maduros, uma mudança mediada por microRNAs que são suprimidos ou superexpressos. A tabela do anexo X apresenta as principais famílias de microRNAs reguladoras do *WAT* identificadas em um trabalho de revisão (14) (é importante ressaltar que essas não são as únicas famílias de microRNAs identificadas até o momento reguladoras do *WAT*; há muitas outras famílias que são citadas em outros trabalhos de outros autores).

2. OBJETIVO

Investigar alterações de expressão de microRNAs do tecido adiposo branco epididimal de camundongos machos das linhagens C57Bl/6J e FVB/N que desenvolveram obesidade induzida pela dieta (*DIO*).

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar a modulação da expressão de microRNAs em modelo de *DIO* a partir da expressão de genes-alvo obtidos pela análise de *microarray* em animais da linhagem C57/Bl6J;
- Avaliar a modulação da expressão de microRNAs em modelo de *DIO* a partir da expressão de genes-alvo obtidos pela análise de *microarray* em animais da linhagem FVB/N;
- Comparar o padrão de expressão dos microRNAs encontrados com os principais microRNAs citados na literatura relacionados à disfunção do *WAT* na obesidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizamos dados de *microarray* do tecido adiposo branco epididimal de camundongos das linhagens C57Bl/6J e FVB/N que apresentaram aumento ou diminuição da expressão de genes em pelo menos 50% após serem submetidos à dieta *high fat*. O tratamento dos animais e condições de alojamento já foram descritos anteriormente (19).

Os genes selecionados foram utilizados nas plataformas para a predição de quais seriam seus microRNAs reguladores. Para fins comparativos, foram selecionados os principais microRNAs do tecido adiposo branco apresentados na literatura (6, 14, 22).

Na análise *in silico* foram utilizadas duas plataformas *online open source*: Mienturnet (23) (<http://userver.bio.uniroma1.it/apps/mienturnet/>) e miRNet 2.0 (24). Mienturnet foi criado por Licursi *et al.* (2019), implementado em 2018 a partir

do pacote *shiny* do RStudio (<https://cran.r-project.org/web/packages/shiny/>) e atualmente oferece suporte para análise de microRNA de seis organismos vivos, incluindo camundongos (*Mus musculus*) e seres humanos (*Homo sapiens*), predizendo informações dos microRNAs e seus alvos a partir de informações dos websites TargetScan e miRTarBase (25). Como dados de entrada, o Mienturnet aceita miRBase ID ou símbolo oficial dos genes e fornece como saída uma rede de interações entre os microRNAs e seus alvos. Para fins de padronização das informações, as informações utilizadas para construção das redes da plataforma Mienturnet foram obtidas via TargetScan.

A plataforma miRNet começou na versão 1.0 e por conta de *feedbacks* enviados por usuários, novas funcionalidades foram adicionadas à plataforma que atualmente aceita como dados de entrada não só microRNAs e genes, mas também fatores de transcrição, outros RNAs não-codificantes (*ncRNAs*) e SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) (26). Além disso, a plataforma miRNet 2.0. atualmente integra dados de mais websites como miRBase, TAM 2.0., EpimiR, PhenomiR, miRanda, SM2miR, ADmiRE, miR2Disease, HMDD, PharmacomiR, miRTarBase, Tarbase, miRecords, PolymiRTS, TransmiR e SNP2TFBS (24). Como dados de entrada, utilizamos as mesmas listas de genes utilizadas na Mienturnet e de ambas as plataformas obtivemos mapas de redes dos microRNAs com seus genes-alvo. Os mapas serão apresentados a seguir, na seção de resultados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da literatura (6, 14, 22), elegemos 43 miRNAs apontados como *up*-regulados e 21 miRNAs que são *down*-regulados em resposta à dieta *high fat*. Os resultados obtidos de cada plataforma serão discutidos separadamente, nas seções 4.1 e 4.2.

4.1. Mienturnet

Ao submeter esse conjunto de genes à plataforma Mienturnet, dos 558 genes *down*-regulados nos camundongos C57, 552 foram reconhecidos e todos os 704 genes que foram *up*-regulados da mesma linhagem foram reconhecidos. Na linhagem FVB, dos 739 genes *down*-regulados, 725 foram reconhecidos pela plataforma e dos 790 *up*-regulados, 774 foram reconhecidos. O quadro a seguir mostra a relação dos miRNAs levantados na literatura e os miRNAs preditos pela plataforma Mienturnet.

Quadro 1. Comparação quantitativa entre os principais miRNAs expressos no *WAT* e os miRNAs preditos na análise *in silico*.

	Literatura	C57 e FVB	C57			FVB		
			Literatura	Exclusivos	Total	Literatura	Exclusivos	Total
Mirna Up	43	123	18	5	128	22	22	145
Mirna Down	21	133	13	12	145	12	10	143

Nos animais C57 e FVB, dos genes que foram *down*-regulados pela dieta *HFD*, encontramos 128 e 145 miRNAs, respectivamente e 123 foram encontrados em ambas as linhagens. Dos 43 miRNAs apresentados na literatura como *up*-regulados no *WAT*, 18 foram compatíveis com os encontrados na linhagem C57 e 22 na linhagem FVB. Cinco miRNAs foram encontrados exclusivamente em C57, ao passo que 22 miRNAs foram encontrados exclusivamente em FVB. Já dos genes que foram *up*-regulados pela dieta *HDF*, 145 miRNAs foram encontrados em C57 (dos quais 12 foram encontrados exclusivamente nesse grupo) e 143 encontrados em FVB (com 10 miRNAs exclusivos), sendo que ambas as linhagens apresentam 133 miRNAs em comum; dos 21 miRNAs encontrados na literatura como *down*-regulados no tecido, 13 da linhagem C57 foram compatíveis com os miRNAs encontrados na análise e 12 miRNAs de FVB corresponderam à literatura. Os miRNAs exclusivos de cada grupo são citados nominalmente na tabela 1.

Tabela 1. MiRNAs encontrados exclusivamente em cada um dos grupos estudados.

MiRNA Up		MiRNA Down	
C57	FVB	C57	FVB
129-2-3p	21a-5p	7a-5p	30a-5p
191-5p	21c	7b-5p	30e-5p
223-3p	23a-3p	132-3p	31-5p
302d-3p	23b-3p	181a-5p	125b-5p
802-5p	31-5p	18a-5p	129-1-3p
	141-3p	18b-5p	129-2-3p
	144-3p	203-3p	155-5p
	181a-5p	208a-3p	196a-5p
	181b-5p	208b-3p	196b-5p
	181c-5p	212-3p	205-5p
	181d-5p	222-3p	
	193a-3p	499-5p	
	193b-3p		
	200a-3p		
	200b-3p		
	200c-3p		
	205-5p		
	212-3p		
	429-3p		
	455-3p		
	590-5p		
	let-7k		

A própria plataforma Mienturnet organiza a relação dos genes-alvo e seus microRNAs em planilhas e disponibiliza o mapa de rede traçado (*network*) onde os nós são os miRNAs que se relacionam com seus genes-alvo. A figura a seguir mostra os mapas obtidos pela Mienturnet.

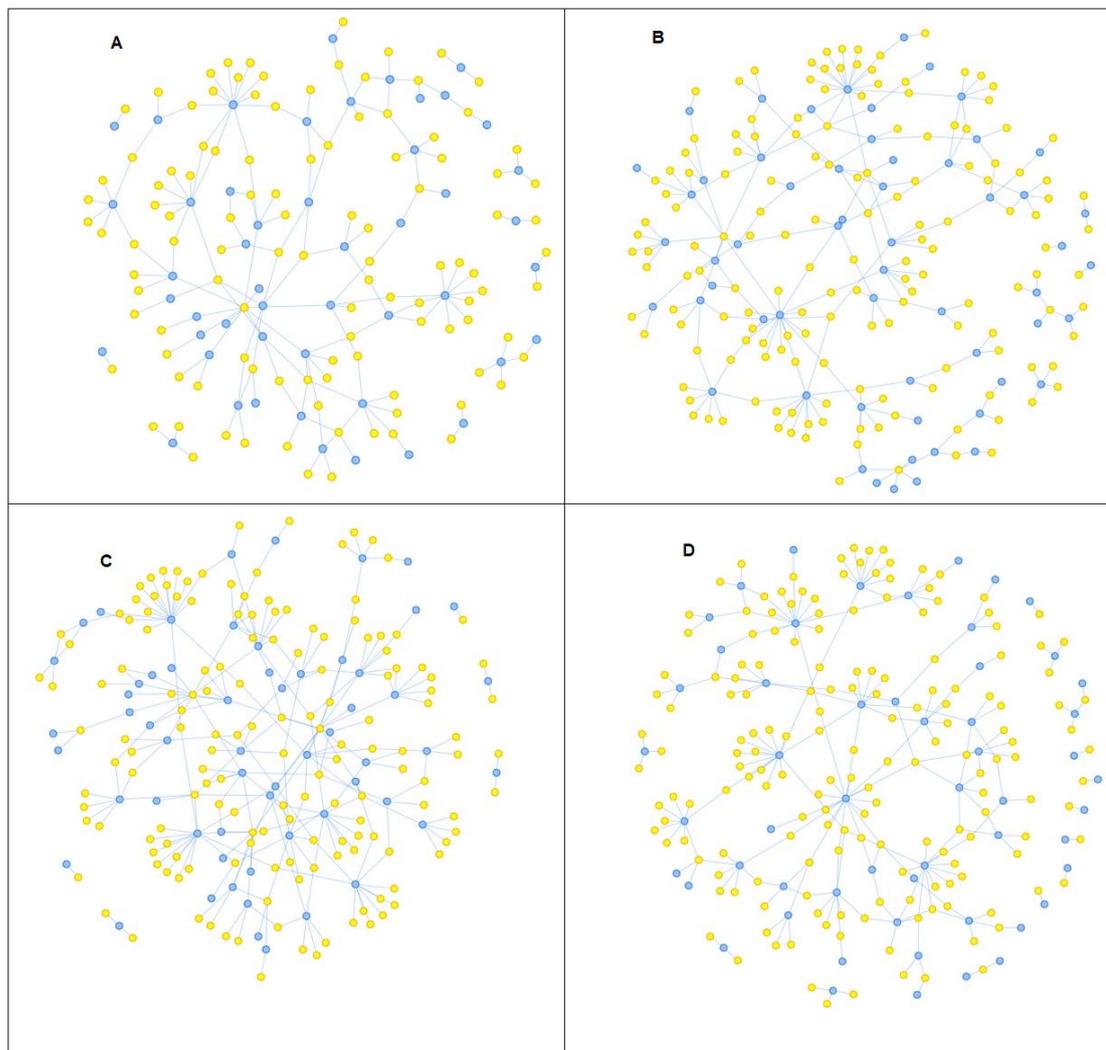


Figura 9. *Networks* obtidos pela plataforma Mienturnet, utilizando *TargetScan*. (A-B): MiRNAs *up* e *down*-regulados em C57, respectivamente e (C-D): miRNAs *up* e *down*-regulados nos animais FVB, respectivamente. Circunferências em azul são os microRNAs preditos e em amarelo são os genes-alvo.

De cada *network* obtido, selecionamos os 5 miRNAs que interagiram com o maior número de genes. Primeiro, apresentaremos os microRNAs *up*-regulados selecionados e seus genes-alvo, listados na tabela a seguir.

Tabela 2. Lista dos genes-alvo e seus microRNAs *up*-regulados obtidos pela análise na plataforma Mienturnet.

C57Bl/6J	Genes	FVB/N	Genes
mmu-miR-15/16/1907/195/322/497/6342/6353/6419	Arl2, Ccnt2, Cldn12, Fbxo21, Igf1r, Lpp, Mknk1, Plekha5, Rnf144b, Sic20a2, Ttc14, Zkscan1	mmu-miR-34/449	Anp32a, Bnc2, Ctdsp2, Cuedc1, Dmwd, Eml5, Fam107a, Limd2, Lzts3, Met, Ndrgr1, Notch1, Nsd1, Rab43, Ralgsps2, Tmem255a, Vamp2
mmu-miR-34/449	Bnc2, Cuedc1, Eml5, Eno3, Fam46a, Lzts3, Met, Ndrgr1, Tmem255a, Vamp2	mmu-let-7/1961/98	Acvr1c, Ccnj, Cldn12, Ddx19b, Dpp3, Klhdc8b, Limd2, Lrig3, Ppargc1b, Ppp1r16b, Slc10a6, Ssh1, Stk40, Tmem110, Zbtb16
mmu-let-7-1961/98	Cacng4, Cldn12, Cpeb1, Hic2, Igf1r, Klhdc8b, Lrig3, Ppargc1b, Slc10a6	mmu-miR-96	Cnmm3, Klh7, Mtor, Nova1, Sox5, Sox6, Yipf4, Zeb1, Zfp449, Zhx2
mmu-miR-137	Atpaf1, Dusp4, Fndc5, Gpcpd1, Jade1, Ppargc1a, Rora	mmu-miR-29	Garre1, Crisp1d1, Dgkd, Dpp3, Has3, Mafg, Nckap5, Nfia, Pdgfc, Per3, Zfp346
mmu-miR-29	Col2a1, Dgkd, Hdac4, Nfia, Pan2, Per3	mmu-miR-124	Bmp6, Ogfod3, Rarg, Rsrc2, Six4, Snta1, Zbtb20, Zcchc24, Zfp449

As figuras a seguir mostram destacados nos mapas de rede esses 5 miRNAs *up*-regulados nos animais C57 e FVB.

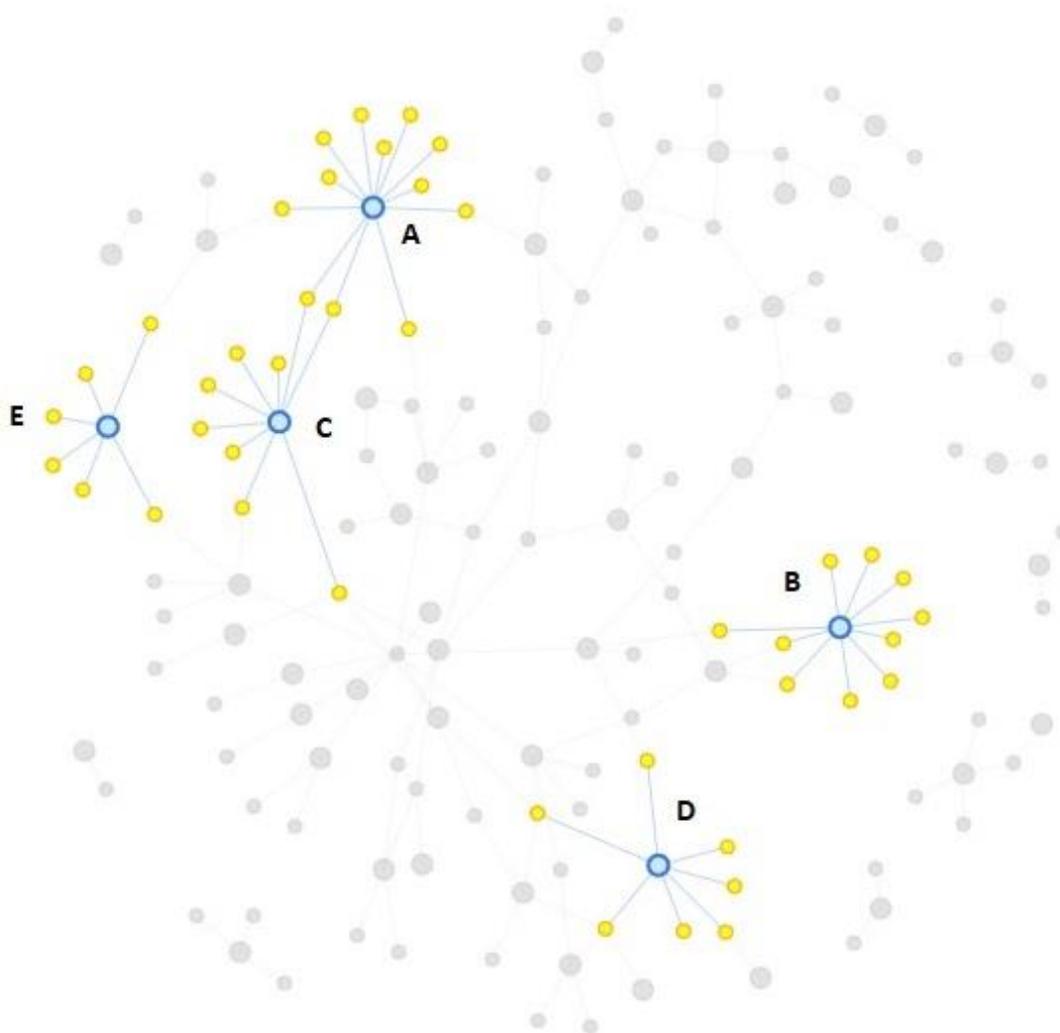


Figura 10. Network dos miRNAs preditos como *up*-regulados em animais C57Bl/6J. (A): mmu-miR-15/16/1907/195/322/497/6342/6353/6419, (B): mmu-miR-34/449, (C): mmu-let-7-1961/98, (D): mmu-miR-137, (E): mmu-miR-29. Esses microRNAs e seus genes-alvo são citados na tabela 2.

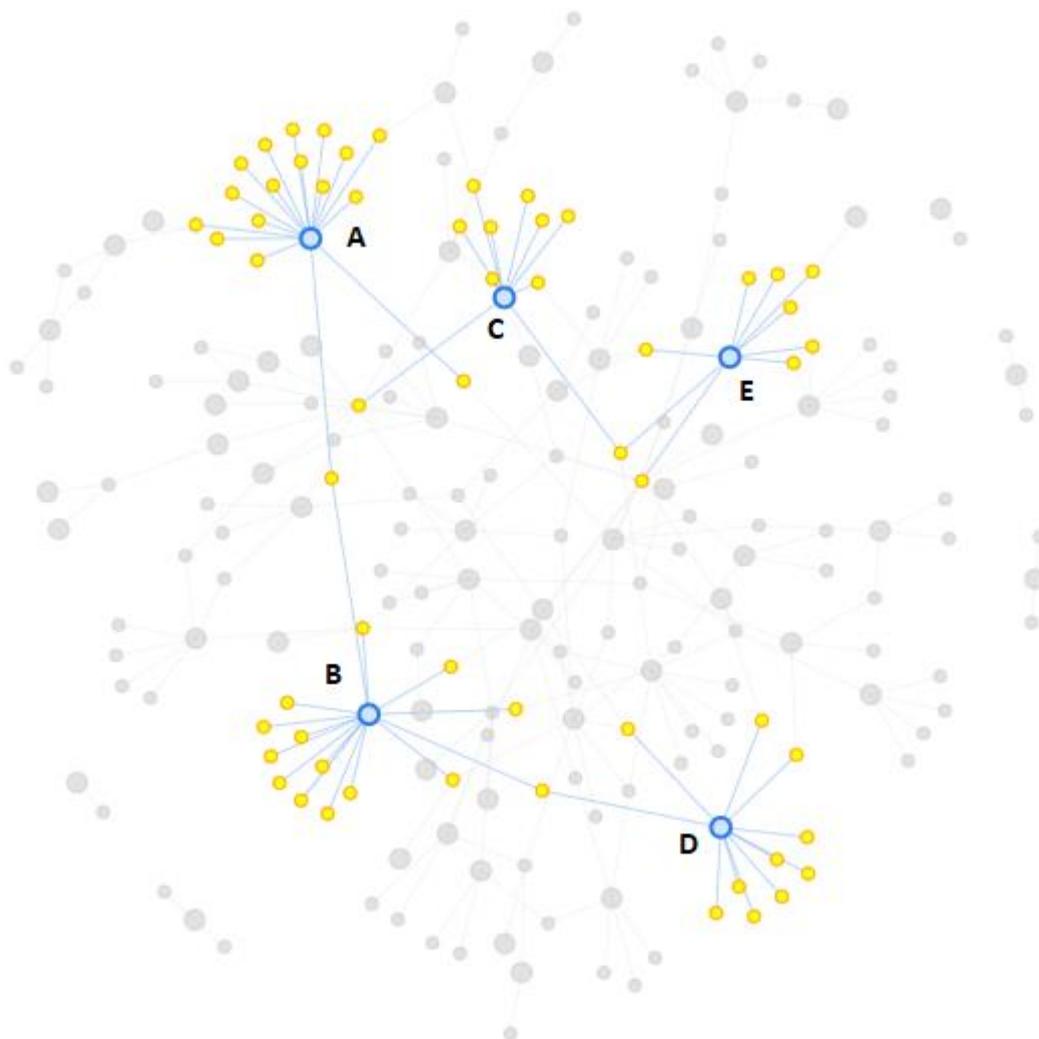


Figura 11. Network dos miRNAs preditos como *up*-regulados em animais FVB/N. (A): mmu-miR-34/449, (B): mmu-let-7/1961/98, (C): mmu-miR-96, (D): mmu-miR-29, (E): mmu-miR-124. Esses microRNAs e seus genes-alvo são citados na tabela 2.

Os miRNAs são apresentados juntos (como por exemplo, mmu-let-7/1961/98) por terem sido obtidos desta maneira pela plataforma. Visualizando os mapas e a tabela 2, é possível notar que os miR-34, 449, 1961, 98, 29 e let-7 se apresentam como *up*-regulados em ambas as linhagens, mas não regulam exatamente os mesmos genes. Destes, apenas o miR-34 é citado na literatura (14) como *up*-regulado e aparece em ambos os grupos de animais. A família miR-34 é constituída pelos microRNAs 34a, 34b e 34c (27); desta família, o miR-34a é o mais citado na literatura e sua expressão se mostra irregular em

indivíduos obesos (14). Um estudo (27) que analisou o *epiWAT* de animais *WT* (*wild-type*) e C57Bl/6J *miR-34a knockout* submetidos à *HFD* mostrou que animais *miR-34a knockout* apresentaram hipertrofia de seus adipócitos, acompanhada do aumento da expressão metabólica de genes relacionados à *de novo* lipogênese (ácido graxo sintase), biossíntese de colesterol e captação de lipídeos (27, 28). Além disso, *miR-34a* tem sido associado à destruição de células- β pancreáticas e diminuição de secreção de insulina através da inibição do gene *VAMP2* (28). É importante apontar que este gene se mostrou um alvo regulado pelo *miR-34* na análise *in silico* na linhagem C57, conforme apresentado na tabela 2.

Nesta análise *in silico*, *let-7* aparece como *up*-regulado em ambas as linhagens estudadas. A família *let-7* é composta de 10 miRNAs maduros (14). Sendo um dos primeiros microRNAs a serem descobertos, apresenta sua sequência e função altamente conservada entre as espécies (uma possível razão para ser encontrado nos grupos C57 e FVB) e é descrito como tendo um papel fundamental na embriogênese, oncogênese, desenvolvimento e metabolismo, sendo mais abundante em adipócitos maduros que em pré-adipócitos no tecido adiposo epididimal (14). *Let-7* é mais bem descrito na literatura como regulador do *BAT* e *brite* ao inibir tanto a termogênese quanto genes marcadores do escurecimento do tecido adiposo.

Do grupo *mmu-miR-15/16/1907/195/322/497/6342/6353/6419*, o único miRNA encontrado na literatura foi o *miR-195*, mais relacionado a estudos do câncer. Um estudo com a linhagem celular *HepG2* mostrou que quando superexpressos, *miR-96* e *miR-195* diminuem a expressão de *FOXO1* (*forkhead box O1*). Uma vez que *FOXO1* é inibido, os níveis de glicose tendem a diminuir (29).

A família *miR-29* apresenta os microRNAs 29a, 29b e 29c e podem apresentar aumento de sua expressão em indivíduos com obesidade, resistência insulínica e T2DM (30). *MiR-29* é mais bem descrito em células β -pancreáticas de camundongos e humanos (30, 31), tendo como alvo genes como *MCT1* (*monocarboxylate transporter*) e *LDHA* (*lactate dehydrogenase A*) (31).

Até o momento, o único estudo encontrado sobre o papel do *miR-124* no metabolismo energético é relacionando-o ao *BAT*, onde os principais alvo são

SCD1 (*stearoyl-CoA-desaturase 1*) e UCP1 (32). Em modelos celulares utilizando as linhagens *HEK293* (renal humana), *SW480* (intestinal humana) e *AT-MSC* (*adipose tissue mesenchymal stem cells*), miR-137 e miR-29b inibiram a expressão de glutathione peroxidase 7 (GPx7), uma enzima presente no lúmen do retículo endoplasmático que apresenta grande relevância no desenvolvimento do tecido mamário e diferenciação de preadipócitos do *WAT* em modelos *in vivo* e *in vitro*. Quando a expressão de GPx7 é suprimida, facilita a diferenciação de preadipócitos em adipócitos maduros, levando à hipertrofia e hiperplasia do *WAT* (33). Curiosamente, muitos miRNAs *up*-regulados também aparecem como *down*-regulados no modelo proposto. A tabela a seguir mostra os microRNAs *down*-regulados em ambas as linhagens e seus genes-alvo.

Tabela 3. Lista dos genes-alvo e seus microRNAs down-regulados obtidos pela análise na plataforma Mienturnet.

	C57Bl/6J	Genes	FVB/N	Genes
MIRNA Down	mmu-miR-29	Adamts2, Angptl4, Bak1, Col3a1, Col4a1, Col4a2, Col6a3, Fbn1, GxyIt2, Has3, Mex3b, Nrep, Pdgfa, Ppic, Sparc, Tubb2a, Zdhhc21	mmu-miR-124	Aldh9a1, Ammecn1, Arpc1b, Cpt1a, Fam122b, Fam129b, Galnt10, Grb2, Gria4, P4ha1, Rhog, Scamp2, Sdf2l1, Smarcd1, Stt3a, Fbxo30, Litaf, Ptpn1, Rhog, Sept11, Zdhhc20, Zfp608
	mmu-miR-124	Ammecn1, Arpc1b, Cpd, Cpt1a, Fam122b, Galnt10, Iggap1, Oaf, Plekht2, Plp2, Rhog, Sdf2l1, Tmed1, Vamp3, Vps35	mmu-let-7/1961/98	Bach1, Calm1, Casp3, Crct1, Ddi2, Efh2, Gan, Gga3, Nras, Pde12, Plag12, Pqlc2, Slc20a1, Smarcd1, Snx16, Snx30, Tgfb1, Uhrf2
	mmu-miR-15/16/1907/195/322/497/634/2/6	Akt3, Ccne1, Clock, Cpd, Cpeb2, Entpd7, Lurap1l, Pcmt1, Phactr2, Rab9b, Slc20a2, Ubrf1	mmu-miR-29	Adamts2, Bak1, Col3a1, Col6a3, Eif4e2, Erp29, Fbn1, Fem1b, Mcl1, Mex3b, Mlit11, Pdgfa, Sms, Tubb2a, Zfp282
	mmu-let-7/1961/98	Cpeb2, Ddi2, Efh2, Ero1l, Gale, Gramd3, Pde12, Pqlc2	mmu-miR-15/16/1907/195/322/497/634/2/6353/6419	Akt3, Arah1, Cacul1, Ccne1, Cnot6l, Entpd7, Med26, N4bp1, Pcmt1, Rasgef1b, Sms, Spred1, Tbp1
	mmu-miR-19	Bambi, Fam114a1, Gatsl2, Sdc1, Socs1, Tnfrsf12a, Vamp3	mmu-miR-125/351/6367/6394	Dtx4, Lactb, Mcl1, Pctp, Ptpn1, Sgpl1, Slc39a9, St8sia4, Tmem168, Tor2a, Zswim6

As figuras a seguir mostram em destaque nos mapas de rede os 5 miRNAs *down*-regulados que regulam a maior quantidade de genes nos animais C57 e FVB.

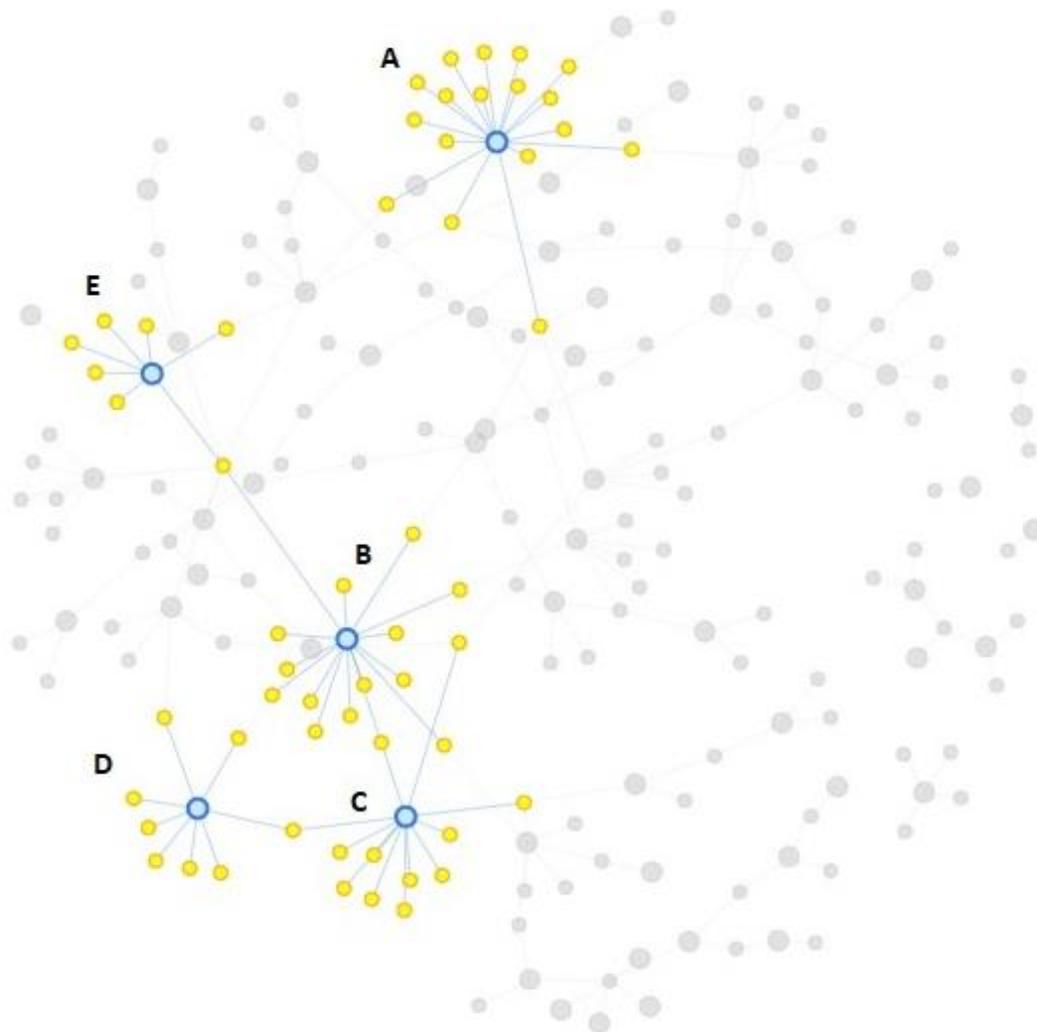


Figura 12. Network dos miRNAs preditos como *down*-regulados em animais C57Bl/6J. (A): mmu-miR-29, (B): mmu-miR-124, (C): mmu-miR-15/16/1907/195/322/497/6342/6353/6419, (D): mmu-let-7/1961/98, (E): mmu-miR-19. Esses microRNAs e seus genes-alvo são listados na tabela 3.

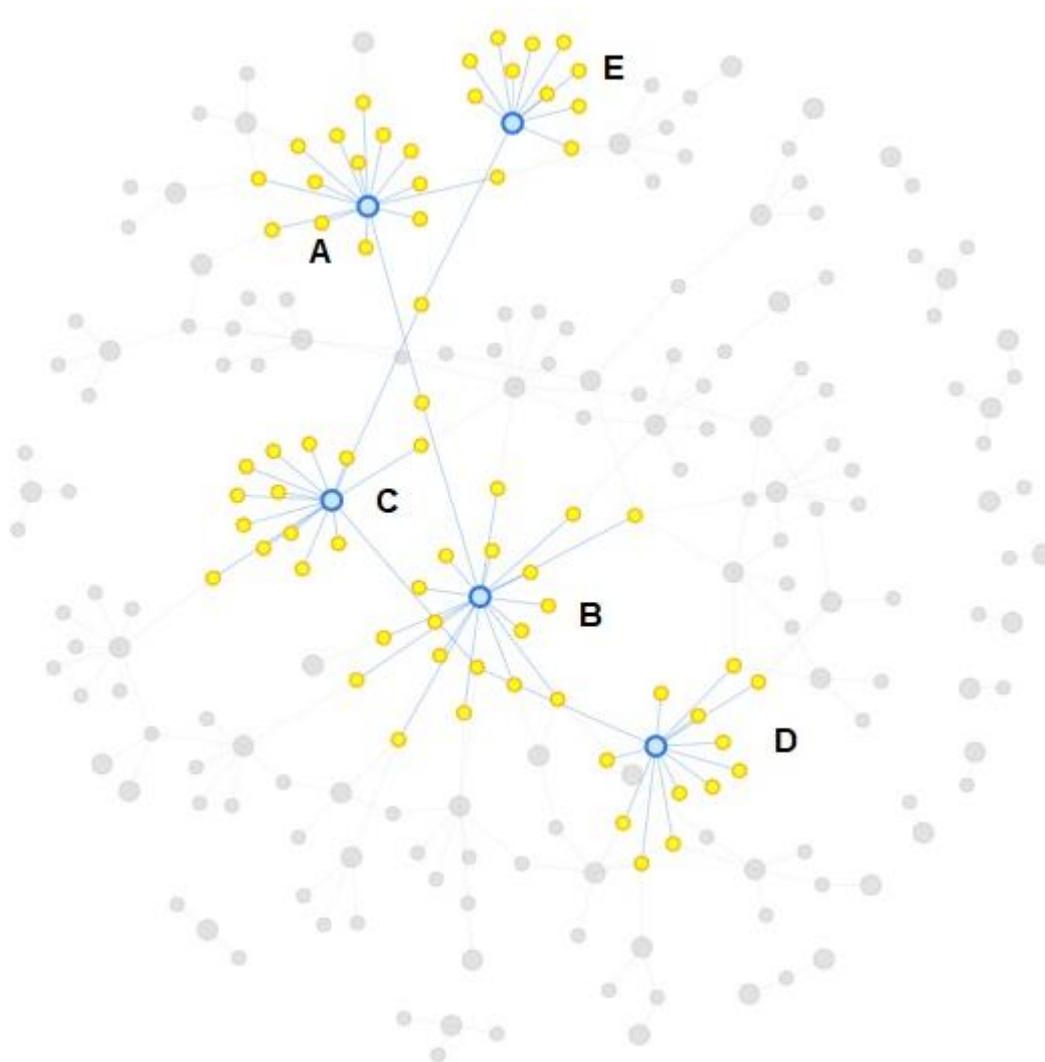


Figura 13. Network dos miRNAs preditos como *down*-regulados em animais FVB/N. (A): mmu-miR-124, (B): mmu-let-7/1961/98, (C): mmu-miR-29, (D): mmu-miR-15/16/1907/195/322/497/6342/6353/6419, (E): mmu-miR-125/351/6367/6394. Esses microRNAs e seus genes-alvo são listados na tabela 3.

Os microRNAs da família let-7/1961/98 apareceram nos quatro grupos de animais estudados, assim como miR-29. MiR-124 e o grande grupo miR-15/16/1907/195/322/497/6342/6353/6419 apareceram em 3 dos 4 grupos de camundongos deste trabalho, evidenciando que os únicos grupos que aparecem exclusivamente como *down*-regulados são miR-19 e o grande grupo miR-125/351/6367/6394. A família miR-125 é bem citada na literatura, representada

pelas subfamílias 125a e 125b. Tanto em camundongos quanto em humanos obesos, a expressão de miR-125b se mostra elevada no *WAT* (preadipócitos) e *BAT*, onde controla a integridade mitocondrial, inibindo sua biogênese e formação de adipócitos do *brite* (6). Quando o miR-125b é *down*-regulado no tecido adiposo subcutâneo, a expressão de *UCP1* e *CIDEA* (*cell death-inducing DNA fragmentation factor-like effector A*) aumenta, resultando na diminuição das gotículas lipídicas armazenadas nos adipócitos (14).

Apesar de ser considerada altamente conservada entre as espécies, a família miR-19 (34) (composta pelos microRNAs 19a, 19b-1 e 19b-2) aparece no nosso estudo apenas na linhagem C57 como *down*-regulado, conforme apresentado na tabela 3. Em modelo *in vitro* (34), quando a adipogênese é induzida pela diferenciação de preadipócitos 3T3-L1, a expressão de miR-19a e 19b diminui. Em casos em que esses miRNAs foram superexpressos ao mesmo tempo, genes lipogênicos como *Pparg*, *Cebpa*, *Adipoq* e *Fasn* foram suprimidos. É importante destacar que miR-19a e 19b apresentam diferenças importantes. Em células *HEK293T*, verificou-se que miR-19b pode se ligar a PPAR γ , inibindo sua expressão. Contudo, a superexpressão do miR-19a não alterou a expressão de *Pparg* ou *Cebpa* (34).

Além de *networks* como opção de saída, Mienturnet também possibilita o desenvolvimento de tabelas com propriedades topográficas, tabelas de interações dos miRNAs e os genes-alvo e gráficos *dot plot* (25), recursos que poderiam ser utilizados em trabalhos posteriores. Na seção a seguir, iniciaremos a discussão dos resultados obtidos com a ferramenta Mirnet.

4.2. Mirnet

Conforme citado na seção de materiais e métodos, submetemos à esta plataforma as mesmas listas de genes utilizadas no Mienturnet. Além de listas de genes, Mirnet aceita como dados de entrada dados de RT-qPCR, listas de ncRNAs, fatores de transcrição, microRNAs, entre outros. Uma característica interessante é que os dados podem ser reunidos em um único arquivo e desde que bem discriminados em uma tabela, a própria plataforma realiza comparações entre os grupos estudados (recomenda-se que os valores de

expressão sejam organizados em colunas com identificação). Apesar de ser descrita como uma ferramenta fácil e intuitiva de ser utilizada (24), Mirnet apresentou uma complexidade muito maior na inserção e obtenção de *networks*, se comparada com a Mienturnet. Infelizmente, não foi possível inserir na plataforma os dados de *microarray* da linhagem FVB. A figura a seguir mostra a mensagem de erro recebida após muitas tentativas de *upload*.

The screenshot shows the miRNet 2.0 web interface. At the top right, a blue error box displays the message: "Error: No significant genes were identified using the given design and cutoff." Below the error box, the main interface is divided into several sections:

- Normalization**: Includes "Normalization procedure" (set to "-- No normalization --") and "Dispersion estimation" (set to "Tagwise dispersions").
- Comparisons of Interest**: Includes "Statistical method" (set to "edgeR (RNAseq); Limma (microarray)") and "Specify comparison" (set to "FVB_Chow" versus "FVB_HFD").
- Feature Selection**: Includes "Adjusted p-value" (set to "0.05"), "Log2 fold change" (set to "1.0"), and "Directions" (set to "Down-regulated only").
- Specify Network**: Includes "Choose target" (set to "microRNA").

At the bottom of the interface, there are buttons for "Try Examples" and "Proceed". A footer note reads: "Xia Lab @ McGill (last updated 2023-04-21)".

Figura 14. Mensagem de erro em uma das tentativas de submeter à plataforma dados da expressão gênica dos animais FVB/N.

Por conta deste erro, optamos por prosseguir com a análise apenas para a linhagem C57Bl/6J. A tabela a seguir mostra os miRNAs em destaque, seguidos da lista de seus genes-alvo.

Tabela 4.

Lista dos genes-alvo e microRNAs em destaque, obtida pela análise na plataforma Mirnet.

MiRNA Up	Genes	MiRNA Down	Genes
mmu-miR-122	Abat, Abcg3, Atf3, Bcl6, Ccl7, Cd300a, Cd68, Cdkn1a, Col6a1, Col6a2, Colec10, Ctss, Ddah1, F7, Fabp7, Gas2l3, Gpnmb, Igsf6, Itgax, Mirc2, Myo1f, Pycr1, Rgs1, Rrad, S100a8, Slamf8, Slc15a3, Tfr2, Tlr13, Tyrobp, Ubd	mmu-miR-155	Accsl, Angpt1, Camk4, Ccdc57, Chchd10, Cish, Crtam, Cyp2f2, Dennd2d, Gpd2, Grem2, H2-Q10, Inmt, Net1, Oscp1, Pcsk4, Per2, Rassf6, Ripk4, Rorc, Tst
mmu-miR-155	Abcg3, Adam8, Amhr2, Asb4, Atf3, Atp6v0d2, Bcl6, Ccl7, Cd300a, Cd68, Cdkn1a, Ckap2l, Col6a1, Col6a2, Colec10, Crlf1, Ctss, Cxcl2, Ddah1, Duoxa1, Evl, F7, Fabp7, Gas2l3, Gpnmb, Il7r, Itgax, Lgals3, Myo1f, Nuf2, Pycr1, Rgs1, Rnase2a, Rrad, S100a8, Slamf8, Slc15a3, Snrnp25, Tyrobp, Ubd, Vsig8, Xcl1	-	-

C57Bl/6J

Ao produzir o mapa, a plataforma já destaca alguns miRNAs e genes, mas pela quantidade de informação contida em cada network, não é possível afirmar se esses nós em destaque se referem aos nós com mais interações ou se seriam os miRNAs e genes mais expressos. A próxima figura mostra os dois mapas obtidos com a ferramenta Mirnet (ambos os mapas também serão apresentados novamente de forma individual posteriormente).

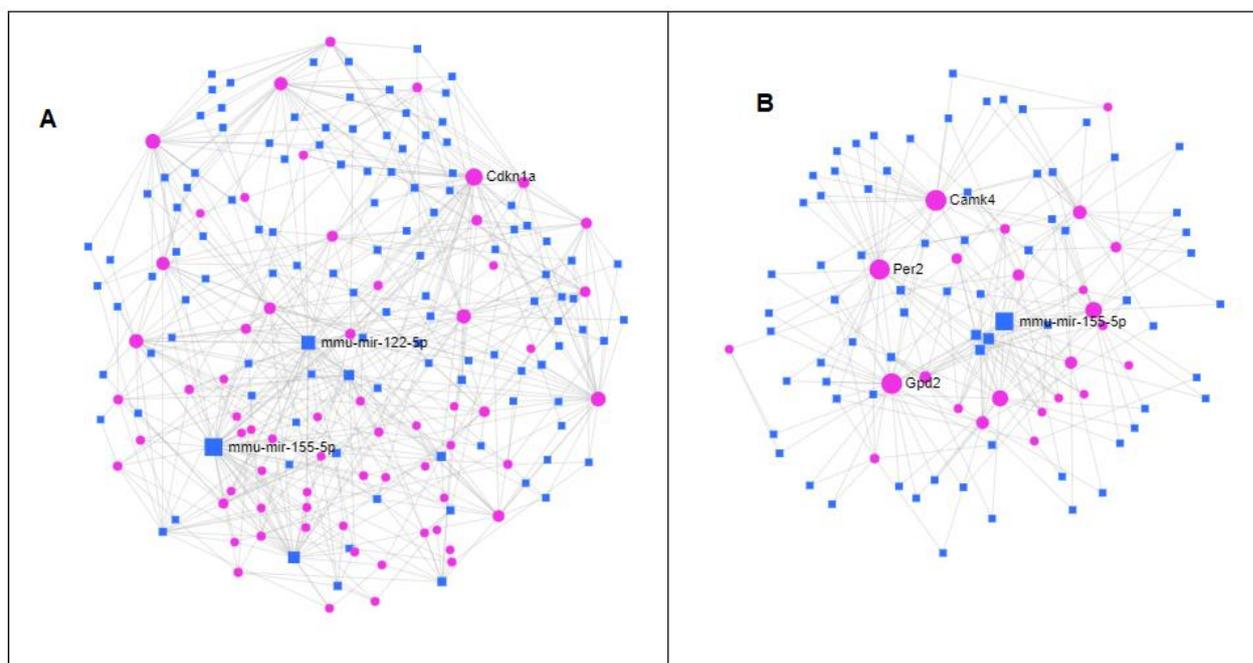


Figura 15. Networks obtidos pela plataforma Mirnet para os animais C57Bl/6J. (A): microRNAs *up*-regulados e (B): microRNA *down*-regulados. Os quadrados azuis são os micro-RNAs preditos e as circunferências cor-de-rosa são os genes.

De 11.189 *probe sets* contidos no arquivo, foram reconhecidos como *up*-regulados 225 miRNAs interagindo com 65 genes (totalizando 290 nós) e como *down*-regulados, 167 miRNAs regulando 24 genes (191 nós); esses nós apresentaram 628 e 337 interações, respectivamente. Pela quantidade de interações, não foi possível selecionar visualmente os 5 miRNAs com mais genes-alvo (inclusive pelos mapas apresentarem mais miRNAs do que genes como nós em cada mapa. Essa pode ser uma característica que diferencia o Mirnet do Mienturnet). As figuras a seguir mostram os mapas da figura 15 separadamente, a fim de facilitar a discussão.

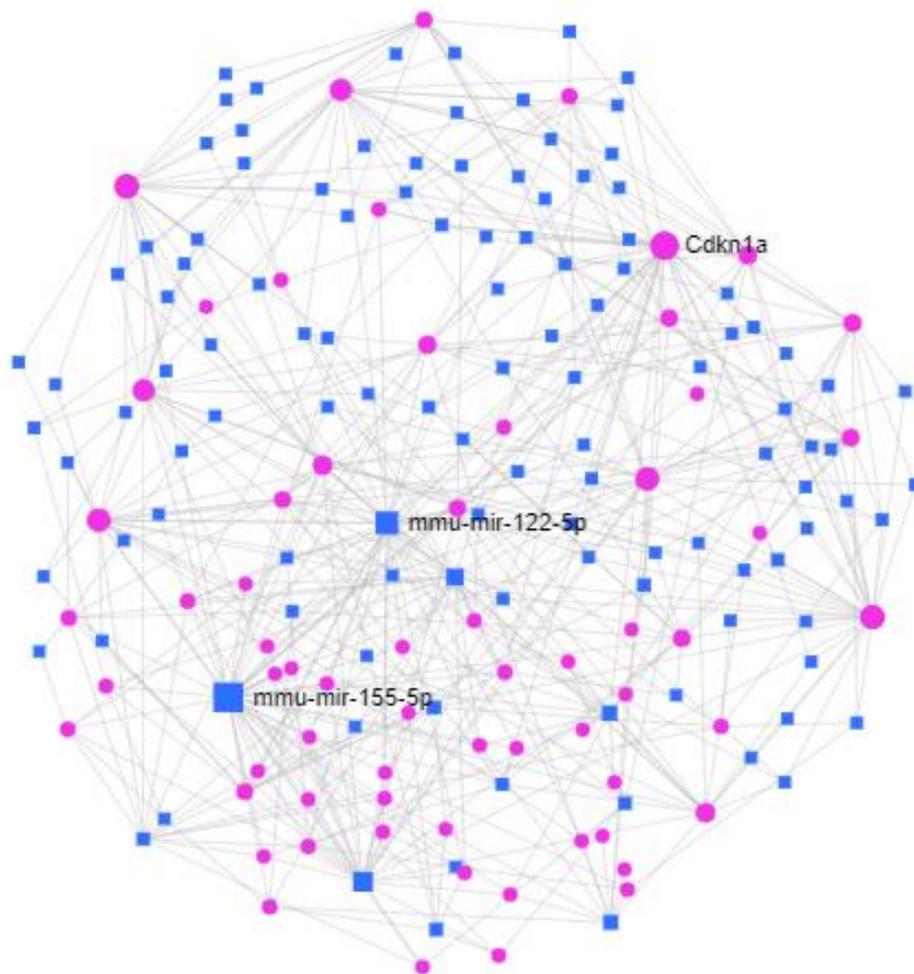


Figura 16. Network obtido pela plataforma Mirnet dos miRNAs *up*-regulados. Em destaque, temos o mmu-miR-122 e mmu-miR-155 e o gene Cdkn1a. Note que os quadrados e circunferências foram desenhadas automaticamente em tamanhos distintos mas, como salientado anteriormente no texto, pela quantidade de interações não é possível saber se esses nós são destacados pelo aumento de expressão ou pela quantidade de interações.

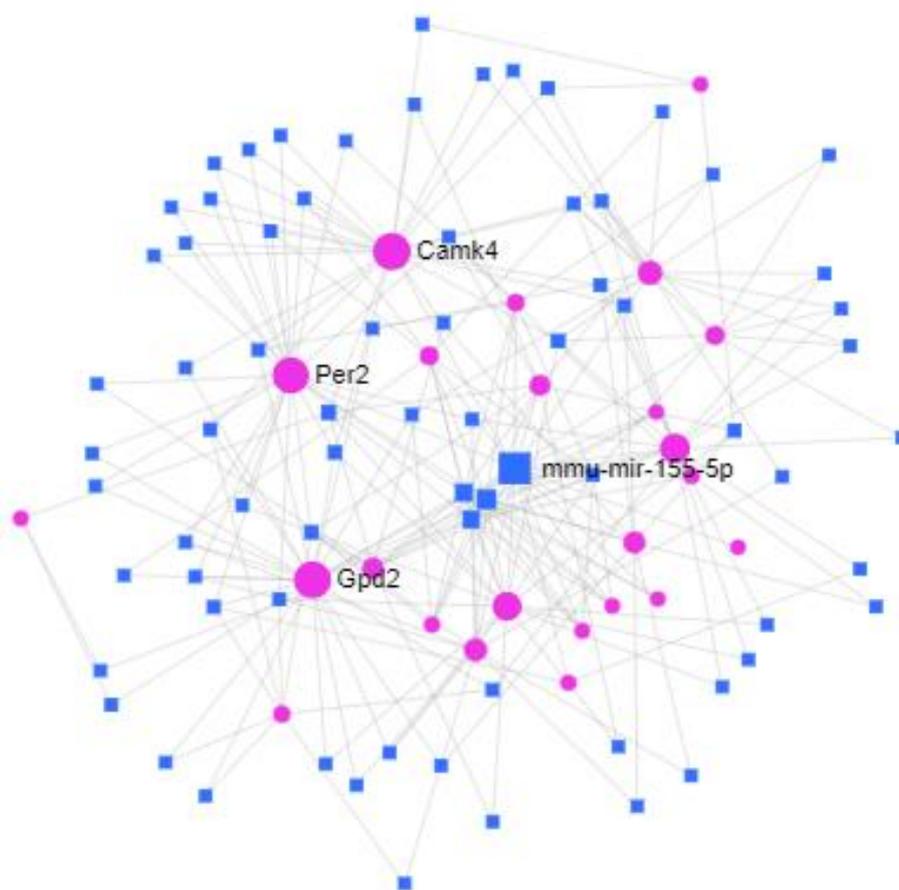


Figura 17. Network obtido pela plataforma Mirnet dos miRNAs *down*-regulados. Em destaque, temos apenas o mmu-miR-155 e os genes Camk4, Gp2 e Per2.

Comparando esses dois mapas e consultando a tabela 4 é possível observar que o gene em destaque na figura 16 é regulado tanto pelo miR-122 quanto pelo 155, assim como na figura 17 vemos que os genes em destaque também são regulados pelo miR-155; a posição desse microRNA nesta análise é controversa. MiR-155 é encontrado tanto no *BAT* quanto no *WAT*, sendo mais bem descrito como inibidor da adipogênese do *BAT*, tendo como alvo o gene *C/ebpb*. Camundongos com baixa expressão de miR-155 apresentam altas taxas de respiração celular e um aumento de adipócitos marrons após serem expostos ao frio; quando camundongos *knockout* para o miR-155 foram submetidos à dieta *high fat*, apresentaram um ganho de peso 56% menor em comparação aos animais *wild type*. Quando miR-155 foi *down*-regulado no *WAT*, os genes *Fabp4*, *Adipoq*, *Fasn*, *Pnpla2*, *Irs1* e *Glut4* foram regulados positivamente (14). Na obesidade, miR-155 contribui para o desenvolvimento do

quadro inflamatório do tecido adiposo ao participar do recrutamento de macrófagos do tipo M1. Quando superexpresso em camundongos, este miRNA diminui a expressão de *UCP1*, podendo comprometer funcionalmente o *BAT* (6). Como as vias de adipogênese do *WAT* e *BAT* apresentam algumas etapas em comum, usualmente algumas famílias de microRNAs aparecem na literatura como reguladoras de ambos os tecidos (14).

Apesar de ter surgido como um miRNA *up*-regulado nesta análise, na literatura o miR-122 é reconhecido por seu papel fundamental no metabolismo lipídico. Contudo, apresenta uma posição conflitante ao ser citado como sendo *up* e *down*-regulado em camundongos submetido à *HFD*. O trabalho publicado que traz esse conflito sugere que tais diferenças podem ocorrer por conta dos modelos animais adotados em cada trabalho, bem como diferenças no tempo de exposição e composição da dieta estabelecidos pelos próprios pesquisadores (22).

Em relação às famílias (por exemplo, miR-181, miR-155) e subfamílias (181a, 181b, 155-3p, 155-5p) citadas nesta monografia, é importante ressaltar que, na literatura, uma família pode ser representada apenas por um miRNA, enquanto os resultados obtidos pela análise *in silico* em ambas as plataformas incluíram subfamílias de miRNA, de modo que a quantidade de microRNAs pode apresentar ligeiras diferenças. Subtipos como 125b-3p e 125b-5p derivam respectivamente da extremidade 3' ou 5' do mesmo pré-miRNA 125b (14).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A escolha da melhor plataforma para análise *in silico* de genes-alvo a fim de predizer seus microRNAs depende da quantidade de dados que fornecido para *upload*. Para este trabalho, a plataforma Mienturnet se mostrou mais simples em relação à Mirnet, com uma interface mais clara e opções que atenderam nossas necessidades, facilitando a realização das comparações entre microRNAs foram *up* e *down*-regulados nos animais C57Bl/6J e FVB/N, quais eram os genes-alvo para cada um desses microRNAs (incluindo genes que eram regulados por diferentes microRNAs). Contudo, a plataforma Mirnet 2.0 oferece mais opções para *upload* dos dados e uma ampla galeria de

possíveis *layouts* dos mapas de redes, caso a quantidade de dados de *input* seja menor.

Dos microRNAs preditos nesta análise, o miR-155 aparece como *down*-regulado em animais FVB pela plataforma Mienturnet e em animais C57 pela plataforma Mirnet, além de ser citado na literatura (14) como sendo *down*-regulado, se mostrando um miRNA promissor a ser investigado (apesar de aparecer como *up*-regulado pelo Mirnet). Apesar do miR-34 aparecer como *up*-regulado e um dos 5 microRNAs que mais regulam genes (tabela 2), ambas as plataformas o apontam como *up* e *down*-regulado, sugerindo que este seja um biomarcador inespecífico do tecido adiposo.

Muitos microRNAs preditos nesta análise ainda não foram descritos na literatura. Selecionar esses miRNAs ainda pouco conhecidos para novos estudos pode ser uma maneira de propor novos alvos terapêuticos ou novos biomarcadores para ensaios *in vitro* ou *in vivo*, gerando resultados mais significativos e assertivos na modulação de genes de interesse.

6. REFERÊNCIAS

1. Alberts Bea. Biologia molecular da célula. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2017. 1427 p.
2. Nelson DL, Cox MM. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2014. 1220 p.
3. Voet D, Voet JG. Bioquímica. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.
4. França NRd, UNIFESP, Mesquita Júnior D, UNIFESP, Lima AB, UNIFESP, et al. Interferência por RNA: uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. Revista Brasileira de Reumatologia. 2023;50:695-702.
5. T S, IP F, S U. Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. The Journal of experimental biology. 2018;221(Pt Suppl 1).

6. GS H, LH C, KG M. The Impact of Adipose Tissue-Derived miRNAs in Metabolic Syndrome, Obesity, and Cancer. *Frontiers in endocrinology*. 2020;11.
7. TA B, AS K, DR Y, CK P, CA P, NM E, et al. Sedentary Behaviors in Today's Youth: Approaches to the Prevention and Management of Childhood Obesity: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2018;138(11).
8. Shimizu Y. WHO - World Health Organization. Obesity. [cited 2023 06 Jun 2023]. Available from: https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1.
9. MG S. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Current hypertension reports*. 2018;20(2).
10. R S-C, S N-C, MÁ M-G, JM O, JA M. Contribution of macronutrients to obesity: implications for precision nutrition. *Nature reviews Endocrinology*. 2020;16(6).
11. LP M, GM A, EP M, TH H, SP C, FJ RC, et al. Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. *The Indian journal of medical research*. 2020;151(1).
12. MD L, YH T. Deciphering adipose tissue heterogeneity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2018;1411(1).
13. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 12^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. 538 p.
14. S G, K S, JE B, MO W, TM B, I K, et al. Regulatory microRNAs in Brown, Brite and White Adipose Tissue. *Cells*. 2020;9(11).
15. HP R, S S-L, T M, MI P. Phytochemicals in regulating fatty acid β -oxidation: Potential underlying mechanisms and their involvement in obesity and weight loss. *Pharmacology & therapeutics*. 2016;165.
16. MI A, RM R, GA C. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation research*. 2011;717(1-2).
17. K W, J H, W P, Y P. The Role of Exportin-5 in MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Genomics, proteomics & bioinformatics*. 2018;16(2).
18. M O, H L, Y D, M M, GA C. MicroRNA Processing and Human Cancer. *Journal of clinical medicine*. 2015;4(8).

19. M N-S, I F-d-C, ACB BM, S M, TT R, TGB G, et al. Is the FVB/N mouse strain truly resistant to diet-induced obesity? *Physiological reports*. 2017;5(9).
20. AC P, A D-S, AP Y, UF M, DT F. Reduced Slc2a4/GLUT4 expression in subcutaneous adipose tissue of monosodium glutamate obese mice is recovered after atorvastatin treatment. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2015;7.
21. C J, BD RK. PPAR gamma gene--a review. *Diabetes & metabolic syndrome*. 2015;9(1).
22. RA W, W D, A H, MB C. High fat diet and associated changes in the expression of micro-RNAs in tissue: Lessons learned from animal studies. *Molecular nutrition & food research*. 2017;61(6).
23. MIENTURNET - MicroRNA Enrichment Turned Network. 2023.
24. miRNet - a miRNA centric network visual analytics platform. 2023. Available from: <https://www.mirnet.ca/>.
25. V L, F C, G F, P P. MIENTURNET: an interactive web tool for microRNA-target enrichment and network-based analysis. *BMC bioinformatics*. 2019;20(1).
26. L C, G Z, O S, J X. miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. *Nucleic acids research*. 2020;48(W1).
27. A S, J G, F R, T F, EM dO. MicroRNAs in Obesity-Associated Disorders: The Role of Exercise Training. *Obesity facts*. 2022;15(2).
28. CA L, M K-S, WM H, I D, M C, A C, et al. miR-34a(-/-) mice are susceptible to diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2016;24(8).
29. H L, H G, X T, Y J, F L, D S-W, et al. Enhanced alleviation of insulin resistance via the IRS-1/Akt/FOXO1 pathway by combining quercetin and EGCG and involving miR-27a-3p and miR-96-5p. *Free radical biology & medicine*. 2022;181.
30. LT D, AE S, AA H, MV J. The microRNA-29 family: role in metabolism and metabolic disease. *American journal of physiology Cell physiology*. 2022;323(2).

31. TJ P, G dSX, G K, GA R. miR-29a and miR-29b contribute to pancreatic beta-cell-specific silencing of monocarboxylate transporter 1 (Mct1). *Molecular and cellular biology*. 2011;31(15).
32. Q L, L W, H L, W R, Z Z, B X. Roles of miR-124-3p/Scd1 in urolithin A-induced brown adipocyte differentiation and succinate-dependent regulation of mitochondrial complex II. *Biochemical and biophysical research communications*. 2022;606.
33. B H, G V, M A, I B, TA K, L S, et al. MicroRNAs mediated regulation of glutathione peroxidase 7 expression and its changes during adipogenesis. *Biochimica et biophysica acta Gene regulatory mechanisms*. 2021;1864(10).
34. P J-V, BM V-R, E O-B, MJ G-B, E M, F C, et al. MiR-19 Family Impairs Adipogenesis by the Downregulation of the PPAR γ Transcriptional Network. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(24).

7. ANEXOS

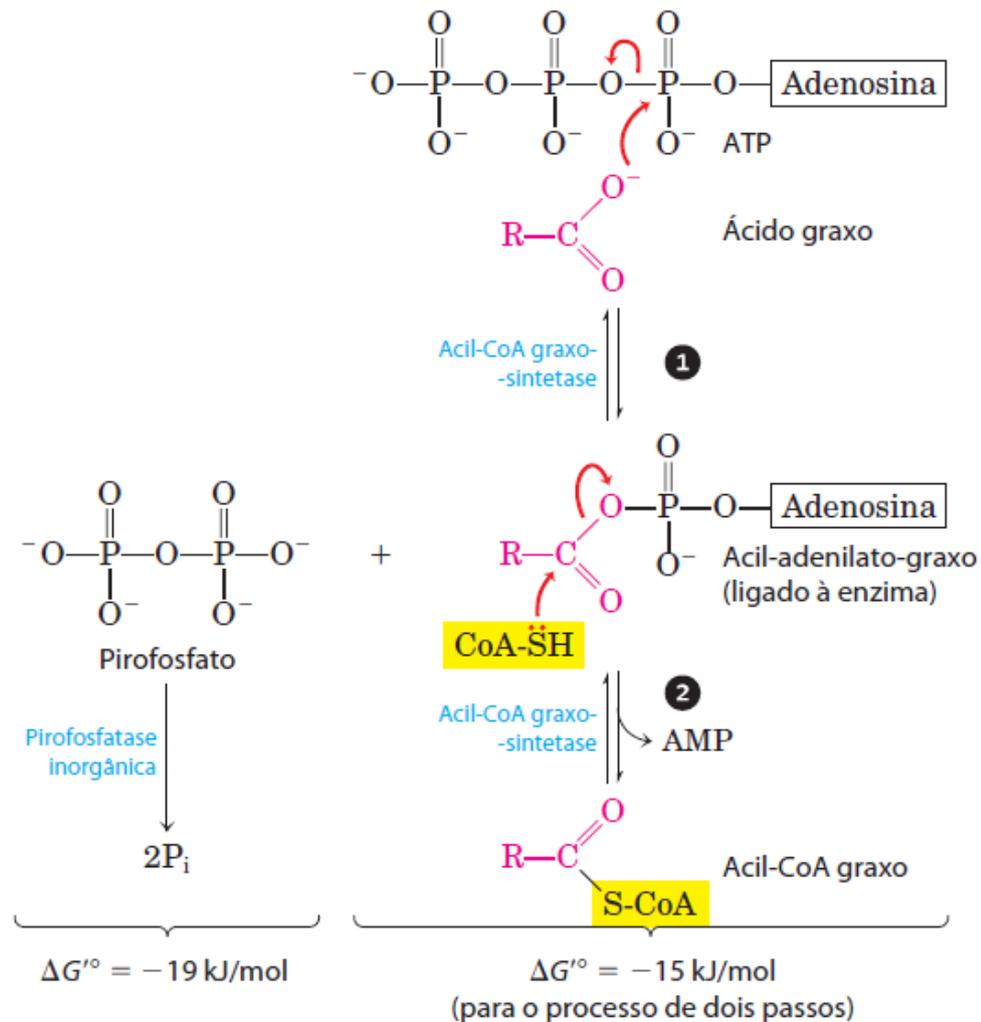
Anexo I. Tabela dos subtipos de obesidade associados a biomarcadores (11).

Obesity subgroup	Study description	Associated or expressed chemical, proteins, cells and index	Related genes
MHO	A cross-sectional sample of 2047 men and women aged 45-74 years ¹⁵	Decreased circulating levels of complement C3, hsCRP, TNF- α , IL-6, and plasminogen activator inhibitor-1 and increased adiponectin ¹¹	-
MAO	A cross-sectional analysis of 7765 with 3135 overweight and obese individuals ¹⁶ . A total of 503 individuals with abdominal obesity without cardiovascular diseases were selected ¹⁷ .	Increase uric acid and visceral adiposity ¹⁸	<i>T45T</i> adiponectin genotype is associated with increase of metabolic disorders ¹⁴
MONW	3015 individuals with abnormal metabolic phenotype in normal-weight adults in a cross-sectional study ¹⁹ . 1244 individuals in a cross-sectional study included ²⁰ . 17029 non-diabetic individuals in a cross-sectional study ²¹ .	Increase in body fat per cent, uric acid and alanine transaminase, decrease in skeletal muscle per cent, and body water per cent ¹³ . Increase in hsCRP, uric acid, cystatin C and leukocytes ¹⁸ . Increase in the production of triglycerides and glucose (TyG index) ¹³ .	Two disparate haplotypes of common <i>FTO</i> gene variants: <i>TCGA</i> and <i>CTAT</i> ¹⁷
SO	854 individuals non-obese. 844 individuals in a cross-sectional study ²² . 3763 in a study cohort ²³ .	Increased hsCRP in serum ²⁴	<i>PTPRD</i> , <i>CDK14</i> , and <i>IMMP2L</i> ¹⁴

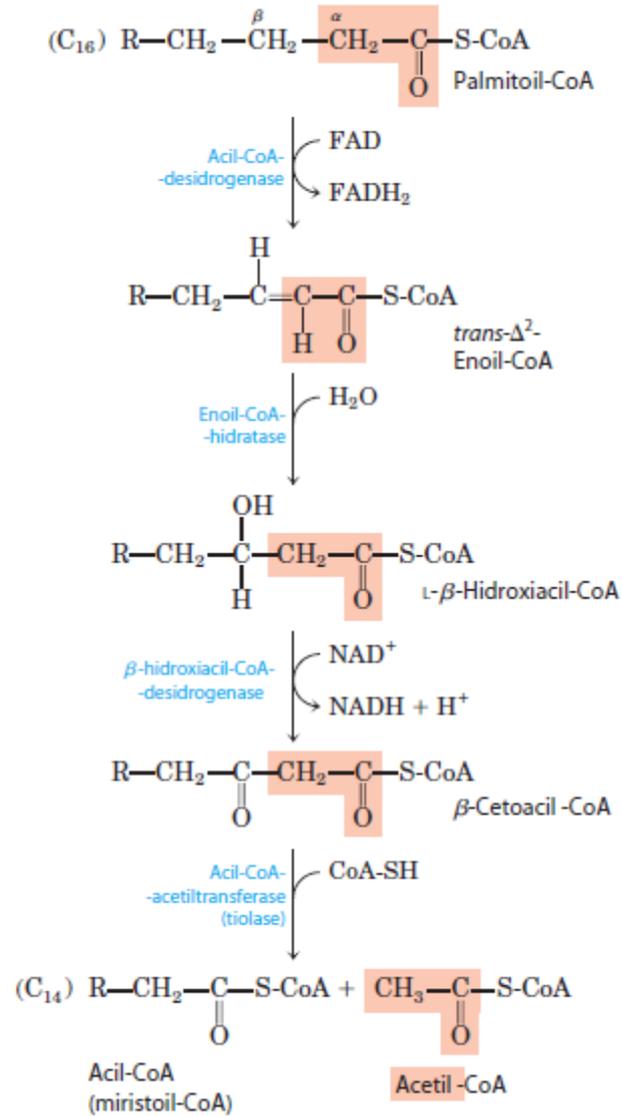
hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; TNF- α , tumour necrosis factor alpha; IL-6, interleukin 6; SO, sarcopenic obese; *PTPRD*, protein tyrosine phosphatase receptor type D; *CDK14*, cyclin dependent kinase 14; *IMMP2L*, inner mitochondrial membrane peptidase subunit 2

Anexo II. Reação de conversão de um ácido graxo em um acil-CoA-graxo. A reação é exergônica e ocorre em duas etapas: adenilação do íon carboxilato pelo ATP formando um acil-adenilato-graxo e PPI (que é hidrolisado imediatamente a duas moléculas de Pi) e formação do tioéster acil-CoA graxo a partir do grupo tiol da coenzima A que ataca o acil-adenilato. Entre essas duas etapas há a formação do acil-graxo-adenilato como intermediário.

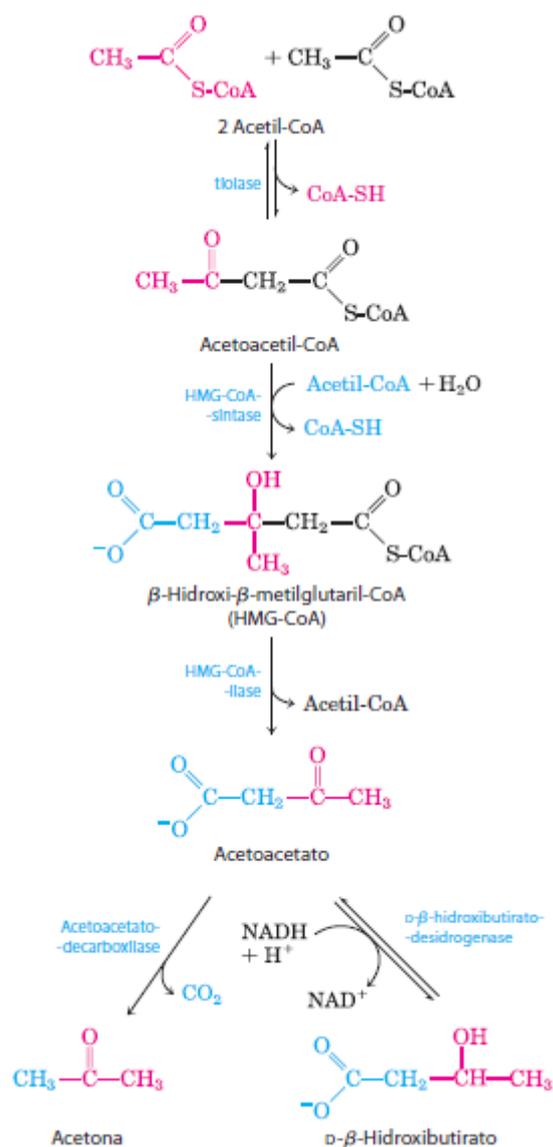
Adaptado de (2).



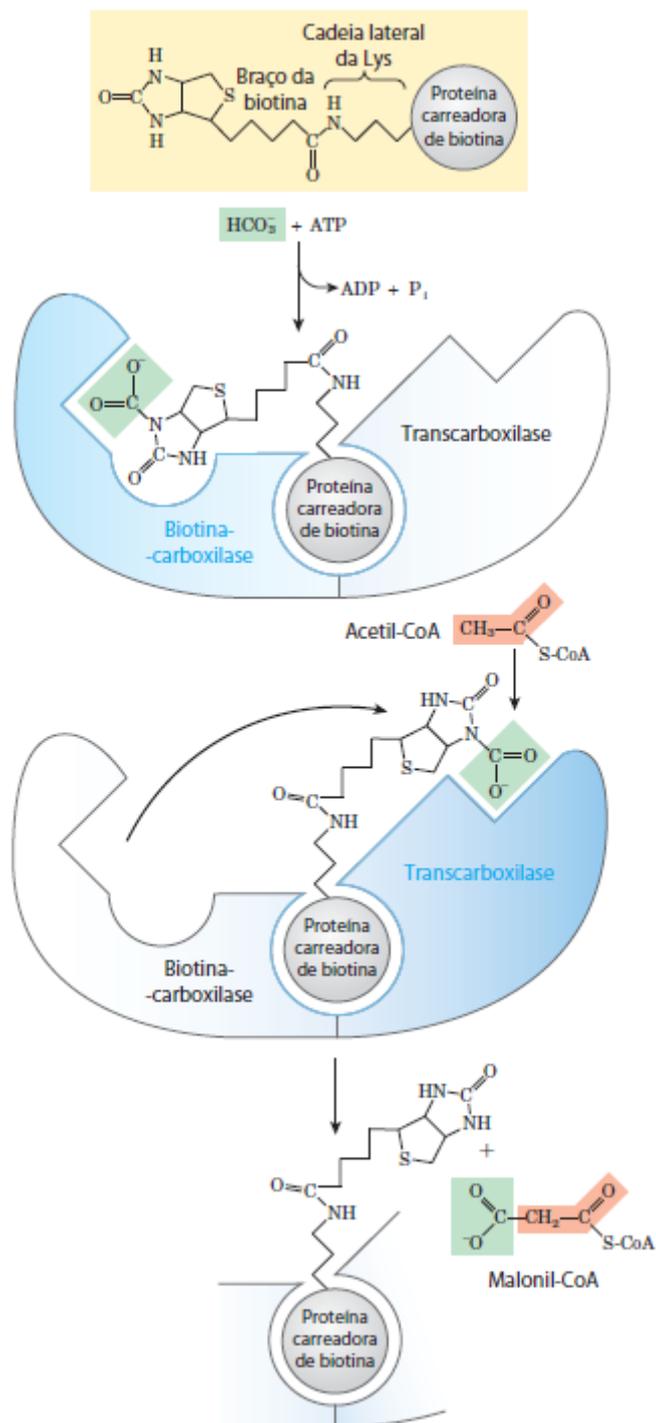
Anexo III. Via da β -oxidação. Em cada passagem da via um resíduo acetil (em destaque rosa) é removido em forma de acetil-CoA da extremidade carboxílica da cadeia do ácido graxo. A figura ilustra o palmitato, que entra como palmitoil-CoA (2).



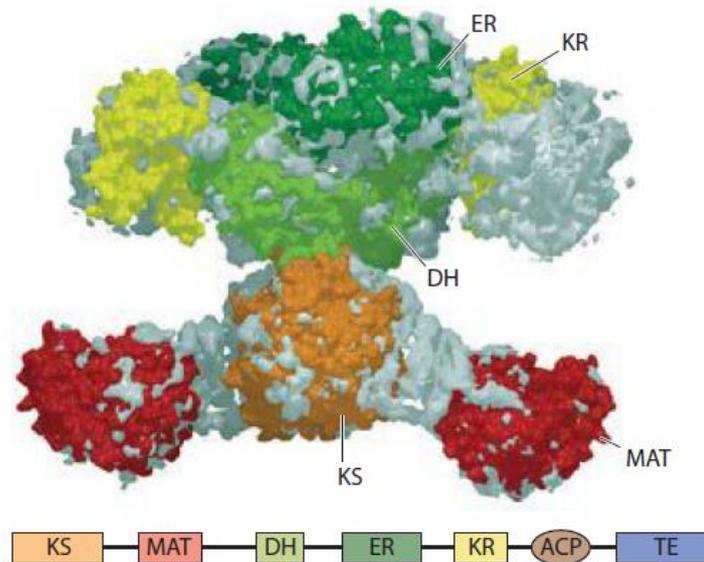
Anexo IV. Formação de corpos cetônicos a partir de acetil-CoA. A enzima tiolase condensa 2 moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA, composto que tem a capacidade de gerar os 3 tipos de corpos cetônicos. Por ação das enzimas acetoacetato-decarboxilase ou D- β -hidroxibutirato-desidrogenase, o acetoacetato pode ser convertido em acetona ou em D- β -hidroxibutirato, respectivamente. (2)



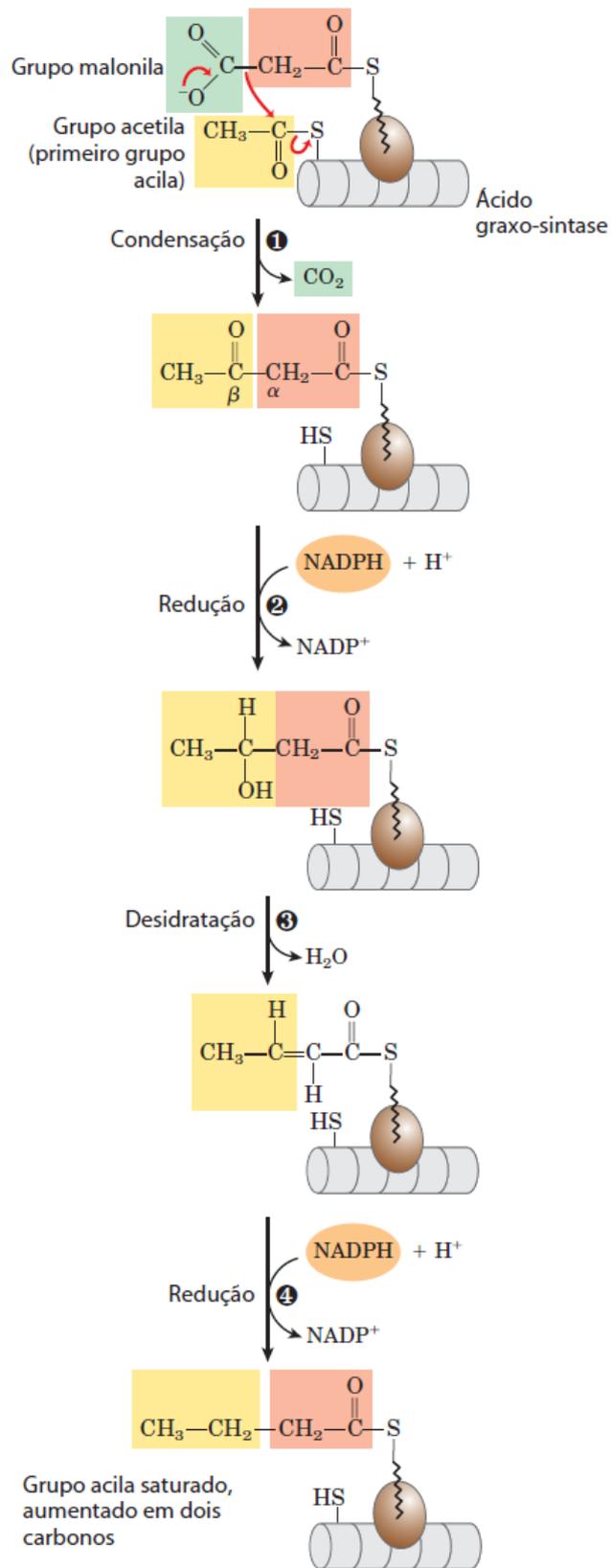
Anexo V. Reação da acetil-CoA-carboxilase (ACC). As regiões sombreadas em azul mostram as regiões ativadas da enzima, em cada etapa (note que malonil-CoA é produzido na última etapa) (2).



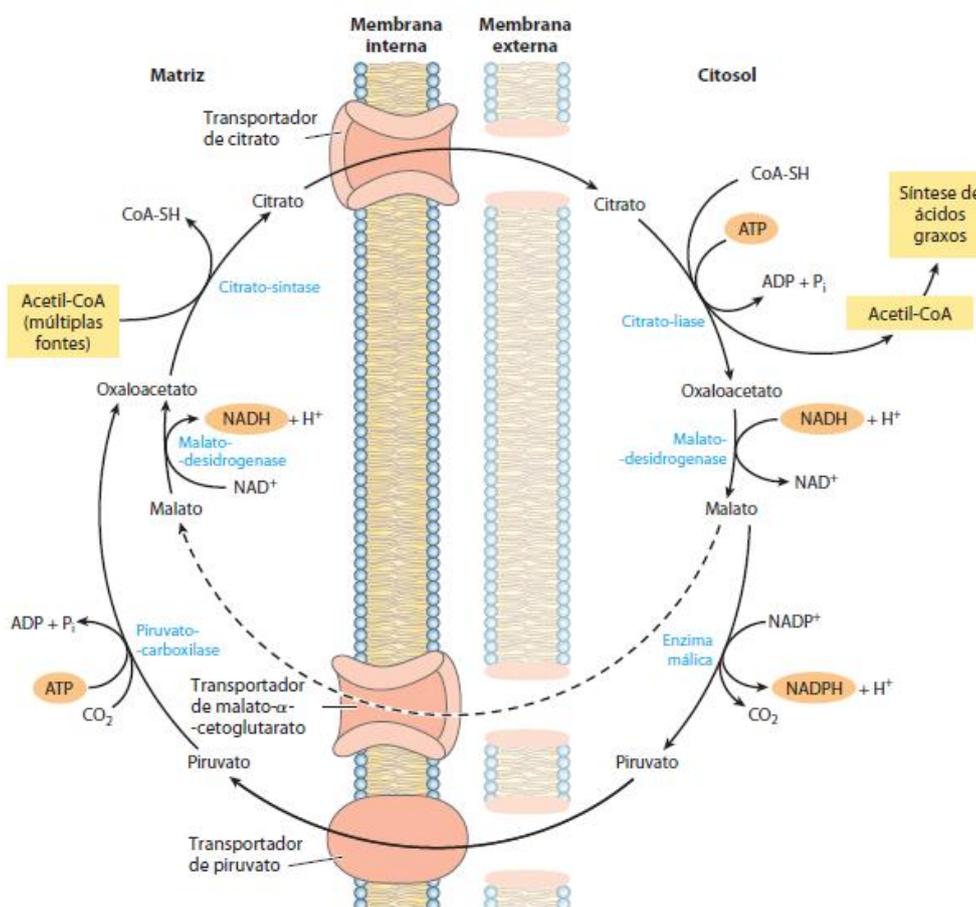
Anexo VI. Complexo AGS I. A enzima é uma única cadeia polipeptídica multifuncional. Em mamíferos, os 7 sítios ativos apresentam atividades enzimáticas distintas e estão localizados em domínios diferentes. KS: β -cetoacil-ACP-sintase; MAT: malonil/acetil-CoA-ACP-transferase; DH: β -hidroxiacil-ACP-desidratase; ER: enoil-ACP-redutase; KR: β -cetoacil-ACP-redutase; ACP: proteína carreadora de grupos acila; TE: tioesterase, libera o palmitato produzido pela ACP quando a síntese é concluída. Como os domínios ACP e TE se encontram desordenados na estrutura cristalina, não foi possível serem representados na estrutura linear do complexo (2).



Anexo VII. Esquematização das 4 etapas de síntese de ácidos graxos por ação da AGS I (2).



Anexo VIII. Exportação de acetato para o citosol na forma de citrato. No interior da mitocôndria, a acetil-CoA (forma ativada do acetato) se une ao oxaloacetato por ação da enzima citrato-sintase formando citrato, reação do ciclo do ácido cítrico. No citosol, por ação da enzima citrato-liase, acetil-CoA e oxaloacetato são regenerados; contudo, para retornar à matriz mitocondrial, o oxaloacetato é reduzido a malato pela malato-desidrogenase (presente no citosol), que retorna para a matriz mitocondrial graças ao transportador malato- α -cetoglutarato (caminho representado pela seta tracejada). O consumo dos dois ATPs citados no trabalho ocorre pelas enzimas citrato-liase e piruvato-carboxilase (2).



Anexo IX. Família de transportadores GLUT expressos em humanos. A tabela apresenta o transportador, o tecido onde é expresso, sua função e o K_t (mM). O K_t ($K_{transporte}$) é uma constante análoga à constante K_m na equação de Michaelis-Menten (2).

Transportador	Tecido(s) onde está expresso	K_t (mM)*	Função†
GLUT1	Ubíquo	3	Captação basal de glicose
GLUT2	Fígado, ilhotas pancreáticas, intestino	17	No fígado e rim, remoção do excesso de glicose do sangue; no pâncreas, regulação da liberação de insulina
GLUT3	Cérebro (neuronal), testículo (esperma)	1,4	Captação basal de glicose
GLUT4	Músculo, gordura, coração	5	Atividade aumentada pela insulina
GLUT5	Intestino (principalmente), testículo, rim	6‡	Transporte principalmente de frutose
GLUT6	Baço, leucócitos, cérebro	>5	Possivelmente sem função de transporte
GLUT7	Intestino delgado, colo	0,3	—
GLUT8	Testículo	~2	—
GLUT9	Fígado, rim	0,6	—
GLUT10	Coração, pulmão, cérebro, fígado, músculo, pâncreas, rim	0,3‡	—
GLUT11	Coração, músculo esquelético, rim	0,16	—
GLUT12	Músculo esquelético, coração, próstata, intestino delgado	—	—

* K_t para a glicose, exceto quando especificado, a partir de Augustin, R. (2010) The protein family of glucose transport facilitators: it's not only about glucose after all. *IUBMB Life* **62**, 315-333.

† O traço indica uma função incerta.

‡ K_m para a frutose.

§ K_m para a 2-desoxiglicose.

Anexo X. Tabela com as principais famílias de microRNAs reguladoras do tecido adiposo branco de determinados modelos de estudo, bem como seus genes-alvo. Adaptado de (14).

Selected key microRNAs (miRNAs) and their reported effects in white adipose tissue (WAT).

miRNA	Function(s)	Target(s)	Reference(s) and Corresponding Study Model(s)
MiR-181	Elevated expression in obese WAT, promotes insulin resistance and inflammation in WAT	<i>PTEN, TNFA</i>	Piglet; in vitro Review Human; mouse
MiR-30a	Stimulates adipogenesis, protects adipocytes against inflammation, prevents polarization of macrophages to the M1 phenotype	<i>STAT1, DLL4</i>	In vitro Mouse; in vitro Human; mouse
MiR-143	Promotes adipocyte differentiation and insulin resistance	<i>ERK5, FGF7, MAP3K7, IGF2R, Opr8</i>	Rat; in vitro In vitro Mouse; in vitro Human; mouse; in vitro Human; in vitro
MiR-103	Pro-adipogenic, increases lipid accumulation, attenuates insulin signaling and promotes apoptosis in pre-adipocytes	<i>RAI14, Caveolin-1, Wnt3a</i>	Piglet; in vitro Human; mouse; in vitro In vitro
MiR-107	Anti-adipogenic, attenuates insulin signaling and promotes apoptosis in pre-adipocytes	<i>CDK6, Caveolin-1, Wnt3a</i>	In vitro Human; mouse; in vitro In vitro
MiR-221	Negative regulator of adipogenesis, pro-inflammatory effects	<i>ETS1, Sirt1, AdipoR1</i>	Human; in vitro Mouse; in vitro
MiR-17	Prevents macrophage-mediated AT inflammation and improves insulin resistance	<i>Ask1, STAT3</i>	Mouse; in vitro Mouse; in vitro
MiR-27a	Anti-adipogenic, upregulated expression in 3T3-L1 adipocytes and <i>ob/ob</i> mice, increased in the circulation of patients with T2DM or obesity	<i>Pparg</i>	In vitro Rat; in vitro
MiR-130	Anti-adipogenic, mediates the inhibitory effects of TNFA on PPARG, pro-inflammatory effects	<i>PPARG, Apcdd1</i>	Mouse; in vitro Human; in vitro Human; mouse; in vitro
MiR-33	Attenuates adipogenesis and lipid accumulation, regulates cholesterol efflux and HDL synthesis	<i>HMGGA2, ABCA1</i>	Mouse; in vitro Monkey; in vitro Human; in vitro
MiR-369-5p	Anti-adipogenic	<i>FABP4</i>	Human; in vitro