

## KARINE COIMBRA DE OLIVEIRA

Relação de miR-103-3p com a obesidade e a circunferência de cintura

**DUQUE DE CAXIAS** 

**Outubro** 

2019

## KARINE COIMBRA DE OLIVEIRA

# Relação de miR-103-3p com a obesidade e a circunferência de cintura

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biomedicina Translacional (PPG-BIOTRANS), como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biomédicas.

## **Orientadores:**

Prof.<sup>a</sup> Cláudia Maria Pereira

Prof. Paulo André da Silva

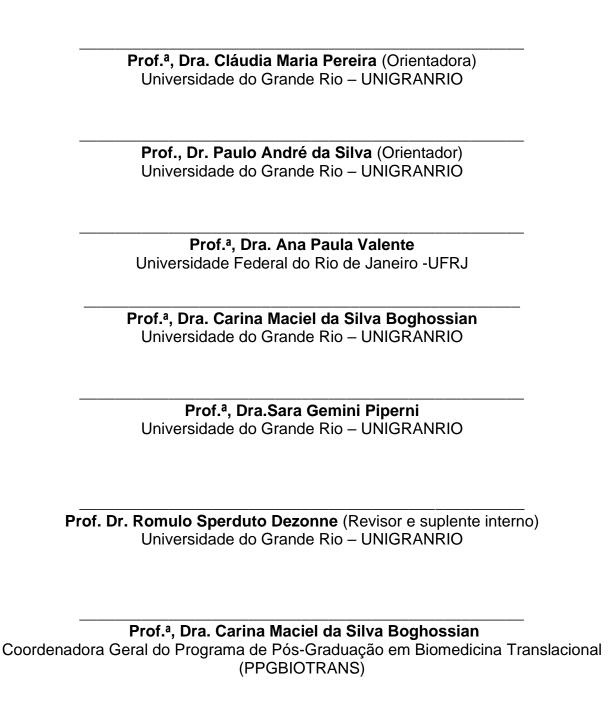
**Duque de Caxias** 

**Outubro** 

2019

### Karine Coimbra de Oliveira

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação (PPG-BIOTRANS), como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biomédicas.



## Karine Coimbra de Oliveira

## OS MICRORNAS REPRESENTAM UM NOVO PARADIGMA NA IDENTIFICAÇÃO PRECOCE DE DOENÇAS CARDIOMETABÓLICAS ASSOCIADAS AO EXCESSO DE PESO?

Dissertação apresentada à Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy" UNIGRANRIO para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas.

Aprovada em 03 de outubro de 2019

## Banca Examinadora

Profa. Dra. Carina Maelel da Silva Boghossian UNIGRANRIO – Universidade do Grande Rio

Profa. Dra. Sara Gemini Piperni UNIGRANRIO – Universidade do Grande Rio

Same Gamas Promise

Profa, Dra, Ana Paula Valente UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Aos meus pais por todo incentivo e apoio e por sempre acreditarem nos meus projetos.

### **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de expressar minha enorme gratidão a todos que foram essenciais para a realização desta dissertação de mestrado.

Em primeiro, agradeço a Deus, pois sem Ele, nada seria possível. Agradeço por ter me abençoado com esta oportunidade e por separar pessoas especiais para me auxiliar nesta jornada.

Aos Doutores Paulo André da Silva e Cláudia Maria Pereira, por terem permitido que eu fizesse parte de seus grupos de trabalho. Agradeço por toda a orientação, pelo compartilhamento do saber, pelo incentivo, disponibilidade em sanar dúvidas e solucionar problemas. Agradeço ainda pelo tema desta dissertação, cuja execução foi um grande desafio para quem é da clínica. Sem dúvidas, todo o curso deste trabalho contribuiu não só para crescimento acadêmico, como também pessoal.

Aos Doutores Emilio Antônio Francischetti e Virginia Genelhu de Abreu Francischetti por nos confiar a execução deste projeto, cujo tema é tão fascinante.

Ao Doutor Rômulo Sperduto Dezonne, gostaria de exprimir minha imensa gratidão por todo o seu comprometimento, paciência, ensinamentos e pela ajuda fundamental para o desenvolvimento do meu trabalho na bancada.

A equipe do Laborafe e Labgen, por toda a colaboração na coleta do material biológico dos pacientes.

Aos meus colegas de laboratório, que muito me auxiliaram desde o recrutamento de pacientes, até a execução dos experimentos. Agradeço pelo agradável convívio, as discussões saudáveis e momentos de confraternização.

Agradeço carinhosamente a Hadassa Almenara, Ana Beatriz Machado e Patrícia Cardoso Oliveira, não só pelo suporte técnico que me foi oferecido, mas também pela amizade.

Aos meus amigos e familiares por entenderem as minhas ausências, mas que sei que sempre estiveram orando e torcendo por mim em todos os momentos.

Por último, mas não menos importante, gostaria de dirigir um agradecimento especial aos meus pais e ao meu irmão, por todo o suporte emocional, por sempre me motivarem, por serem meus exemplos de determinação, amor e honestidade; a vocês dedico este trabalho.

"Ninguém escapa ao sonho de voar, de ultrapassar os limites do espaço onde nasceu, de ver novos lugares e novas gentes. Mas saber ver em cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objeto singular, um amigo, é fundamental. Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas, é mais preciso ainda."

Antoine de Saint-Exupéry

### **RESUMO**

A obesidade é resultante de interações comportamentais, causas genéticas e epigenéticas e está relacionada a doenças cardiometabólicas, como hipertensão arterial e diabetes mellitus tipo 2. Os microRNAs (miRNAs) fazem parte do maquinário epigenético que modulam a expressão gênica, processo que pode estar alterado em diferentes tipos de patologias, incluindo a obesidade; estes podem ser encontrados na forma intracelular ou no meio extracelular, estando estes últimos presentes nos mais variados fluidos corporais. A estabilidade destas moléculas nos fluidos corporais e o método pouco invasivo para sua obtenção tem despertado o interesse nestas moléculas para sua utilização como biomarcadores para o diagnóstico precoce e alvos terapêuticos. Este estudo teve como objetivo avaliar a expressão dos miRNAs circulantes: miRNA-17-5p, miRNA-103-3p e miRNA-375-3p por qPCR em adultos jovens e associar estes resultados com os dados antropométricos e bioquímicos. A população deste estudo foi composta por 32 indíviduos com idade entre 20 a 45 anos, recrutados entre funcionários e alunos da UNIGRANRIO. Os indivíduos foram classificados em três grupos de acordo com o índice de massa coporal em: eutróficos, sobrepeso e obeso. Foram coletadas amostras de soro para a extração dos miRNAs circulantes e análise por qPCR. Não foram encontradas diferenças de expressão significativas para miR-17-5p e miR-375-3p. Entretanto, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para o miR-103-3p entre eutróficos e obesos (p=0,03) e uma tendência à hipoexpresão entre sobrepeso e obesos (p=0,05). Além disto, foi encontrada uma correlação negativa entre miR-103-3p e circunferência de cintura (r=0,354, p=0,040). Observou-se ainda uma correlação positiva entre miR-17-5p, miR-375-3p e miR-103-3p. Como conclusão, este estudo sugere que o miR-103-3p possa representar um biomarcador aceitável para a detecção precoce de doenças cardiometabólicas relacionadas à obesidade.

**Palavras-chave**: obesidade, biomarcadores, miRNAs circulantes, miR-17-5p, miR-103-3p, miR-375-3p.

### **ABSTRACT**

Obesity results from behavioral interactions, genetic and epigenetic causes and is related to cardiometabolic diseases, such as hypertension and type 2 diabetes mellitus (T2DM). MicroRNAs (miRNAs) takes part of the epigenetic machinery that modulates gene expression, and this process may be altered in many types of pathologies, including obesity. MiRNAs can be found in both the in the intra and extracellular medium (circulating); extracellular miRNAs are present in the most of different body fluids, the stability of these molecules in body fluids and the noninvasive method for obtaining them has led to interest in these molecules for their use as biomarkers for early diagnosis and therapeutic targets. This study aimed to evaluate the expression of circulating miRNAs: miRNA-17-5p, miRNA-103-3p and miRNA-375-3p by qPCR; in young adults and to associate the results with the anthropometric and biochemical data. Population of this study was composed of 32 young adults aged 20 to 45 years old recruited between employees and students of UNIGRANRIO. These individuals were classified into three groups according to body mass index (BMI) in normal weight, overweight and obese. Serum samples were collected to miRNA circulation extraction and qPCR analysis. No significant expression differences were found for miR-17-5p and miR-375. However, there is a significant difference in the expression of miR-103-3p between normal weight and obese (p = 0.03) and a downregutation trend between overweight and obese (p = 0.05). In addition, a negative correlation was found between miR-103-3p and waist circumference (r = 0.354, p = 0.040). A positive correlation was also observed among miR-17-5p, miR-375-3p and miR-103-3p. In conclusion, this study suggests that miR-103-3p may represent a reliable biomarker for cardiometabolic diseases related to obesity.

**Key words:** obesity, biomarkers, circulating miRNAs, miR-17-5p, miR-103-3p, miR-375-3p.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1	Mapa da obesidade no mundo	
Figura 2	Distribuição anatômica do tecido adiposo	6
Figura 3	Diferenças histológicas entre os adipócitos branco, marrom e bege	7
Figura 4	igura 4 Mecanismos que levam à resistência à insulina a partir da hipertrofia dos adipócitos	
Figura 5	Biogênese dos miRNAs	15
Figura 6	Transporte extracelular dos miRNAS	17
Figura 7	Resumo das abordagens técnicas utilizadas no estudo	26
Figura 8	Fluxograma da padronização do protocolo de extração de miRNAs circulantes	31
Figura 9	Avaliação do número de centrifugações e controles endógenos em plasma e soro	36
Figura 10	Avaliação dos controles endógenos no soro	37
Figura 11	Figura 11 Análise de expressão de miR-17-5p, miR-103-3p e miR-375-3p po qPCR nos gru <i>p</i> os eutrófico, sobrepeso e obeso	
Figura 12	Análise de expressão dos miR-17-5p por qPCR sem os <i>outliers</i>	43
Figura 13	Expressão dos miRNAs por qPCR em todas as amostras	44

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Classificação internacional da obesidade de acordo com o índice de massa corporal (IMC) e risco para desenvolvimento de doenças	4
Tabela 1	Dados demográficos, clínicos e bioquímicos da população do estudo	39
Tabela 2	Expressão dos miRNAs circulantes no grupo de eutróficos, sobrepeso e obesos	41

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA Do inglês, American Diabetes Association

AP2 Do inglês, Activating Protein 2

DCV Doenças cardiovasculares

DM2 Diabetes Mellitus Tipo 2

CC Circunferência de cintura

C/EBPα Do inglês, CCAAT/ Enhancer binding protein alpha

CEP Comitê de Ética em pesquisa

CT Colesterol total

CQ Circunferência de quadril

ECA Enzima conversora da angiotensina

EU Eutrófico

ERK Do inglês, Extracellular signal–regulated kinases

GBD Do inglês, Global Burden Disease

HA Hipertensão Arterial

HDL-C HDL-Colesterol

HOMA-IR Modelo de Avaliação da Homeostase para Resistência à Insulina

IDF Do inglês, International Diabetes Federation

IL-6 Interleucina-6

INF-γ Interferon-gama

IMC Índice de Massa Corporal

IRC Insuficiência Renal Crônica

JNK Do inglês, *c-Jun N-terminal kinase* 

LDL-C LDL- colesterol

MAPK Do inglês, Mitogen Activated Protein Kinases

mRNA RNA mensageiro

.

MIRNAS MicroRNAS

MTOR Do inglês, Mammalian Target of Rapamycin

NF-κB Do inglês, Factor Nuclear Kappa B

OB Obeso

PA Pressão Arterial

PAD Pressão Arterial Diastólica

PAM Pressão Arterial Média

PAS Pressão Arterial Sistólica

PPG Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional

RCQ Razão cintura/quadril

RI Resistência à insulina

SBC Sociedade Brasileira de Cardiologia

SBD Sociedade Brasileira de Diabetes

SM Síndrome Metabólica

SP Sobrepeso

SRA Sistema Renina Angiotensina

SRAA Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

TAB Tecido Adiposo Branco

TABg Tecido Adiposo Bege

TAM Tecido Adiposo Marrom

TCLE Termo De Consentimento Livre e Esclarecido

TG Triglicerídeos

TGFB Do inglês, Transforming Growth Factor Beta

UCP1 Proteína Desacopladora 1

UNIGRANRIO Universidade do Grande Rio

UTR Do inglês, *Untranslated Region* 

WCRF Do inglês, World Cancer Research Fund

WHO Do inglês, World Health Organization

WOF Do inglês, World Obesity Federation

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO		
1.1	A obe	sidade	2
1.2	Obesidade e Adiposopatia		
1.3	Obesi	dade e Comorbidades	9
	1.3.1	Resistência a insulina e Diabetes Mellitus tipo 2	9
	1.3.2	Hipertensão arterial	12
1.4	A obe	sidade e os miRNAs	13
	1.4.1	miR-17-5p	20
	1.4.2	miR-103-3p	21
	1.4.3	miR-375-3p	22
2	JUSTIFICATIVA		24
3	OBJE	TIVO	25
	3.1	Objetivo geral	25
	3.2	Objetivos específicos	25
4	METO	DOLOGIA	26
	4.1	Desenho do estudo	26
	4.2	Casuística	27
	4.3	Medidas Antropométricas	28
	4.4	Determinação da Pressão Arterial	29
	4.5	Ensaios Bioquímicos	29
	4.6	Padronização do protocolo de extração de miRNAs circulantes	30
	4.7	Coleta de sangue periférico	32
	4.8	Extração de RNA das amostras	32

	4.9	Confecção de cDNA	33
	4.10	Análise dos miRNAs por PCR quantitativa (qPCR)	33
	4.11	Análises de dados	34
5	RESU	LTADOS	35
	5.1	Padronização do protocolo de extração de miRNAs circulantes	35
	5.2	Caracterização da população do estudo	37
	5.3	Avaliação da expressão de miR-17-5p, miR-103-3p e miR-375-3p nos diferentes grupos do estudo	40
	5.4	Relação da expressão de miR-17-5p, miR-103-3p e miR-375-3p nos diferentes e os grupos analisados	42
	5.5	Correlação entre expressão miR-17-5p, miR-103-3p e miR-375-3p com as variáveis demográficas, antropométricas e bioquímicas dos pacientes analisados	45
6	DISC	JSSÃO	47
7	CONC	CLUSÃO	55
	REFE	RÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
	ANEX	os	

## 1 INTRODUÇÃO

O fenômeno da globalização e o crescente processo de urbanização contribuíram para modificações nos padrões alimentares e, por consequência, produziram um aumento na prevalência de indivíduos com excesso de peso e portadores de doenças crônicas (POPKIN *et al.*,2012). De acordo com o *Global Burden Disease, de* modo geral o percentual de indivíduos com obesidade e sobrepeso vem aumentando em todo o mundo, sendo superior em países em desenvolvimento, comparados aos desenvolvidos (*GBD*, 2015).

Nos últimos anos, houve um aumento significativo de estudos para a melhor compreensão da fisiopatologia e fatores de risco para doenças crônicas como: obesidade, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares, que, em conjunto, constituem a maior causa de mortalidade e morbidade em todo o mundo (BASTIEN et al., 2014; KACHUR et al., 2018). Por tratar-se de distúrbios que assumem proporções de pandemia e consequentemente um problema de saúde pública (WHO, 2017), desperta um grande interesse pela busca de novos biomarcadores que seriam utilizados como ferramenta de diagnóstico e terapia para uma variedade de doenças, tais como as doenças metabólicas (FERNÁNDEZ-BERGÉS et al., 2014)

As alterações epigenéticas estão relacionadas a processos importantes de regulação da transcrição e são reconhecidos como fortes candidatos para a avaliação do risco de doenças metabólicas alterada pelo meio ambiente (SALES et al., 2017). Dentre as modificações epigenéticas estão inclusas: metilação do DNA; modificações de histonas; RNAs não codificantes, onde estão inseridos os microRNAS, moléculas estas que podem auxiliar na compreensão de como as células com um mesmo DNA podem se diferenciar em células e fenótipos distintos (LING e GROOP, 2009).

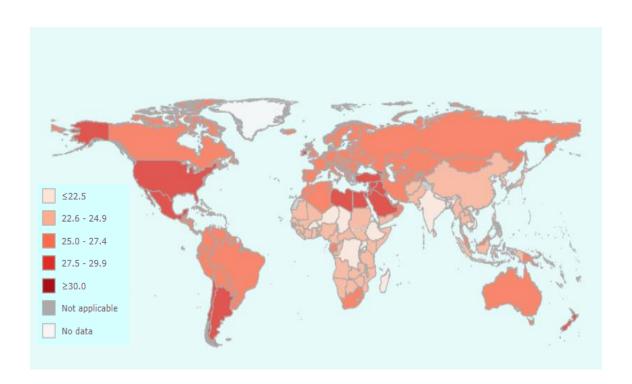
Nesse contexto, a identificação de biomarcadores para diagnóstico precoce de distúrbios metabólicos a fim de prevenir os efeitos deletérios dessas doenças e facilitar as intervenções terapêuticas, configura-se um grande desafio principalmente na faixa etária dos indivíduos jovens (CARRARO *et al.*, 2015).

### 1.1 A obesidade

A obesidade é um problema de saúde pública que cresce de maneira rápida, assumindo proporções de epidemia global (WHO, 2017). Esta epidemia teve seu início por volta da década de 1970, mostrando nos primeiros anos uma progressão irregular, seguida de um aumento expressivo a partir dos anos 80 (FINUCANE et al., 2011; FLEGAL et al., 2012).

Reconhecida como doença, a obesidade juntamente com o excesso de peso, apresenta uma taxa global de aproximadamente 35% (NG et al, 2014); taxas que, ao longo dos últimos 30 anos, têm aumentado. Sua prevalência foi quase que duplicada entre os anos de 1980 e 2014, quando 39% dos adultos com idade maior ou igual a 18 anos, possuíam excesso de peso, com maior predominância nas mulheres. Esta maior incidência de sobrepeso/obesidade está relacionada ao nível de renda do país, sendo que os países mais desenvolvidos apresentam maior incidência do que os países em desenvolvimento (Figura 1) (WHO, 2017).

**Figura 1. Mapa da obesidade no mundo.** Observa-se que as cores mais escuras representam percentuais mais altos de obesidade. Nota-se ainda que o Brasil esta incluído nos países que apresentam uma incidência de 25 a 27,4 % de indivíduos obesos na faixa etária maior ou igual a 18 anos. Fonte: *World Health Organization*, 2017.



Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostraram que em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos, com idade maior ou igual a 18 anos, apresentavam excesso de peso e destes, 1,25 bilhão eram obesos (WHO, 2017). Estima-se que 2,7 bilhões de indivíduos adultos estarão com excesso de peso e cerca de mais de 1 bilhão serão obesos em 2025, segundo a *World Obesity Federation* (WOF, 2015). Nos Estados Unidos, aproximadamente 40% da população adulta é portadora de obesidade (FRYAR *et al.*, 2018). No Brasil, mais de 50% da população apresenta sobrepeso e 18,9% dos brasileiros são obesos (VIGITEL, 2017).

Mais de 300.000 mortes são anualmente atribuídas à obesidade ou sobrepeso na população adulta americana (FLEGAL *et al.*, 2010; SOWERS, 2013). Entretanto, aproximadamente 30% de obesos não apresentam parâmetros clínicos ou laboratoriais indicativos de distúrbios cardiometabólicos GENELHU *et al.*, 2009). Para estes pacientes, definidos como paradoxo da obesidade por serem "obesos metabolicamente saudáveis", o comprometimento da qualidade de vida estaria relacionado às restrições decorrentes de alterações no sistema osteomuscular (KARELIS, 2008).

Ressalta-se a etiologia multifatorial e complexa da obesidade, resultante da interação de uma série de fatores como os antecedentes genéticos, endócrinos, ambientais e comportamentais, nos quais estão inseridos os hábitos alimentares não saudáveis e o sedentarismo (MARTÍNEZ et al., 2008). A interação desses fatores ocorre de forma complexa e exerce influência nos padrões de alimentação e consumo, assim como os padrões comportamentais, que cooperam para o balanço energético positivo, ganho de peso excessivo e por consequência, a obesidade (ROMIEU et al, 2017).

Apesar da etiologia multifatorial, o desequilíbrio energético entre a ingesta de calorias e o gasto calórico, é considerado uma das causas cruciais para a obesidade e o sobrepeso (WHO, 2018), pois quando o consumo é igual ao gasto, há a manutenção do peso corporal e do contrário, ocorre o ganho de peso que é estocado especificamente em forma de gordura (ANDERSON *et al*, 2015); isto poderia ser explicado devido aos hábitos de vida cada vez mais sendentários, influenciados pela progressão da urbanização e aumento da ingesta de produtos abundantes em carboidratos (WHO, 2018).

A OMS classifica a obesidade a partir do índice de massa corporal (IMC), através da equação em que o peso em quilogramas é dividido pelo quadrado da altura em metros (kg/m²). Este parâmetro tem sido utilizado para classificação de estados nutricionais, abrangendo desde desnutrição ao excesso de peso/obesidade (Quadro 1). Os graus de obesidade ainda podem variar do grau I até o III, e quanto mais elevado este índice, maiores são os riscos para o desenvolvimento de doenças associadas (WHO, 2017).

**Quadro 1.** Classificação internacional da obesidade de acordo com o índice de massa corporal (IMC) e risco para desenvolvimento de doenças.

IMC (kg/m²)	Classificação	Risco de Doença
< 18,5	Baixo peso	Normal ou elevado
18,5-24,9	Peso Normal ou eutrófico	Normal
25-29,9	Sobrepeso	Pouco elevado
30-34,9	Obesidade grau I	Elevado
35-39.9	Obesidade grau II	Muito elevado
≥ 40,0	Obesidade grau III	Muitíssimo elevado

Fonte: World Health Organization, 2017 (Adaptado).

Apesar do IMC ser amplamente utilizado em diversos estudos epidemiológicos, por ser considerado um bom marcador, acessível prático (ROMIEU et al., 2017), esta medida está relacionada ao peso corporal total e não a composição corporal ou a distribuição da gordura. Isso indica que em algumas situações muito específicas podem ocorrem erros na interpretação destes resultados, pois se um indivíduo apresenta um percentual de massa magra e peso corporal muito alto, ele será classificado como obeso. Ainda existem diferenças pertinentes ao sexo, etnia, idade e prática ou não de exercícios físicos (SUN et al., 2010).

Diante disto, outros parâmetros são necessários para complementar a avaliação da composição corporal e da distribuição da gordura na obesidade/excesso de peso como: circunferência da cintura (CC), circunferência de quadril (CQ) e a relação cintura-quadril (RCQ), medidas utilizadas para a

identificação de obesidade central, que está intimamente relacionada a disfunções do tecido adiposo como aumento da secreção de ácidos graxos, adipocinas, hiperinsulinemia, resistência à insulina, hipertensão e dislipidemia (CARR e BRUNZELL, 2004; ASHWELL e GIBSON, 2016).

A obesidade está relacionada com diversas doenças, gerando altos custos para a economia dos países acometidos por ela, constituindo assim um importante problema de saúde pública (*World Cancer Research Fund* - WCRF, 2018). Evidências epidemiológicas robustas indicam que esta pandemia exerce um grande impacto sobre a qualidade de vida dos indivíduos (BUSUTIL *et al.*, 2017) devido à sua correlação com comorbidades, tais como: doenças cardiovasculares e metabólicas, como hipertensão arterial (HA), DM2, dislipidemia, osteorartrite, distúrbios psicológicos, doença hepática não alcoólica, além de estar associada a um estado pró-inflamatório, pró-trombótico e fatores pró-oncogênicos (DANAEI *et al.*, 2009; WHITLOCK *et al.*, 2009; BAYS, 2011; SAMANIC *et al.*, 2006; DIXON, 2010).

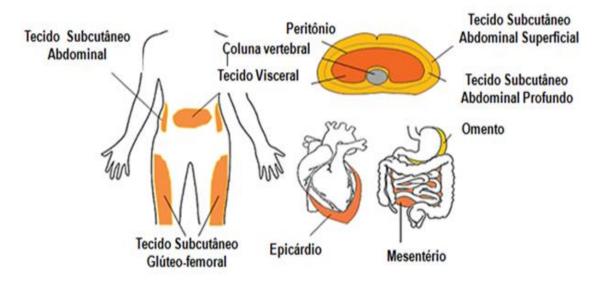
## 1.2 Obesidade e Adiposopatia

Na obesidade, são observadas anormalidades anatômicas e funcionais dos adipócitos e do tecido adiposo. Esse conjunto de alterações é denominado adiposopatia (BAYS, 2011). Está associada a uma série de anormalidades metabólicas, já citadas anteriormente, muito comuns na prática clínica e também consideradas epidemias (BAYS, 2008).

O conceito de tecido adiposo apenas como estrutura de sustentação e depósito de lipídeos perdurou até o início dos anos 1990 (ZHANG *et al.*, 1994; KWOK *et al.*, 2016; KWON e PESSIN, 2013; SINGLA *et al.*, 2010). Este conceito foi desconstruído a partir da descoberta da leptina (ZHANG *et al.*, 1994), quando observou-see que o tecido adiposo possuía toda uma estrutura para síntese e secreção de hormônios, admitindo assim sua função endócrina e envolvimento numa variedade de processos metabólicos (KWON e PESSIN; SINGLA *et al.*, 2010).

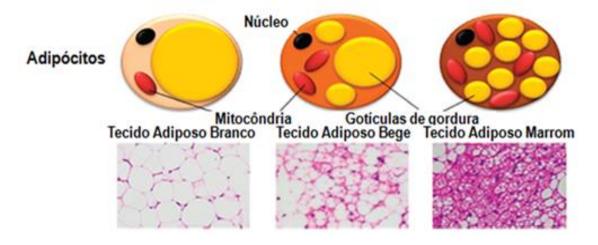
O tecido adiposo é classificado de acordo com sua morfologia e distribuição no organismo. De acordo com sua localização, o tecido subcutâneo pode ser dividido em superficial, profundo e visceral **(Figura 2)** (KWOK *et al.,* 2016)

Figura 2. Distribuição anatômica do tecido adiposo corporal. Os depósitos de tecido adiposo branco estão destacados em tons de laranja. Amplamente distribuído no corpo humano, localiza-se principalmente na região subcutânea e glúteo-femoral, e na região visceral (omento, mesentério, região mediastinal e epicárdico), ao redor de órgãos vitais do peritônio e caixa torácica. Na região subcutânea tem como função atuar como barreira de proteção contra infecções na derme, isolante térmico e amortecedor contra o estresse mecânico. (Adaptada de Kwok *et al. in Experimental & Molecular Medicine*, 2016).



Do ponto de vista morfofuncional, as células adiposas podem ser classificadas em três tipos: o adipócito branco, que apresenta uma única gota de gordura que ocupa quase todo citosol, apresentando também, pequenas quantidades de mitocôndrias; o adipócito marrom apresenta diversas gotículas de gordura distribuídas por todo citosol e uma grande quantidade de mitocôndrias (**Figura 3**) (VIRTANEN et al., 2009; SAELY *et al.*, 2012; ADAMCZAK e WIECEK, 2013). Verificou-se mais recentemente a existência do adipócito bege, que possui características intermediárias entre as do branco e do marrom (**Figura 3**) (WU *et al.*, 2013).

Figura 3. Diferenças histológicas entre os adipócitos branco, marrom e bege. Tecido adiposo branco (TAB) caracterizado pela presença de uma grande gotícula de gordura que desloca o núcleo e mitocôndrias para a periferia da célula. Tecido adiposo marrom (TAM), cuja coloração se deve a presença em maior quantidade de mitocôndrias e uma quantidade menor de gotículas de gorduras; e o tecido adiposo bege com características intermediárias entre o TAB e TAM; características observadas a partir de cortes histológicos dos três tipos de tecidos adiposo corados com hematoxilina/eosina (aumento de 40x). Adaptada de Kwok et al. in Experimental & Molecular Medicine, 2016.



O tecido adiposo branco (TAB) está distribuído por todo o corpo, encontrado em grandes depósitos na região subcutânea e abdominal, além da região gluteofemoral, músculos, coração e mesentério (**Figura 2**) (KWOK *et al.,* 2016). Uma característica importante deste adipócito é a produção de uma grande quantidade de adipocitocinas de ação local e sistêmica, que controlam tanto os níveis inflamatórios como o apetite. Tem-se como exemplo a leptina (COSTA E DUARTE, 2006; MATSUZAWA, 2006).

Nos indivíduos obesos, com a expansão do tecido adiposo branco, ocorre a hiperplasia e/ou hipertrofia dos adipócitos (TCHOUKALOVA *et al.*,2010), promovendo alterações funcionais e no número de adipócitos, que por sua vez, contribuiem para o desenvolvimento de complicações como dislipidemia, HA e DM2 (LEVELT *et al.*, 2016). Admite-se que estas alterações sejam causadas pela inflamação local, crônica e subclínica (MONTEIRO e AZEVEDO, 2010).

Estudos comparando os depósitos de TAB visceral e subcutâneo, verificaram que os depósitos viscerais apresentam um perfil com características pró-inflamatórias (LEE *et al.*, 2013; HOCKING *et al.*,2010), com maior de secreção de citocinas como Interleucina 6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF-α), proteína C-reativa (SAMARAS *et al.*, 2010) e fator inibitório de migração de macrófagos (ALVEHUS *et al.*,2010). Em contrapartida, nos depósitos

subcutâneos de TAB, verificou-se uma maior expressão de adipocitocinas com efeitos anti-inflamatórios, tal como a adiponectina, que exerce efeitos benéficos sobre o metabolismo (XU e VANHOUTTE, 2012; KADOWAKI *et al.*, 2006).

O tecido adiposo marron (TAM) é encontrado predominantemente em pequenos mamíferos e em crianças, e funciona como uma forma adaptativa de resistir a baixas temperaturas a partir da transformação dos nutrientes em energia química sob forma de calor (HARMS e SEALE, 2013; KAJIMURA et al., 2010). Tem como principal função principal aumentar a termogênese, fato que se deve a presença do grande número de mitocôndrias (CANNON e NEDERGAARD, 2004). Encontra-se distribuído em regiões preferenciais como a cervical, paravertebrais, mediastino, supraclavicular, axilar e na parte superior da região abdominal (SAELY et al., 2012).

Apesar do volume total e localização do tecido marrom serem menores quando comparado ao tecido adiposo branco (NEDERGAARD et al, 2010), estudos em modelo animal sugeriram que o TAM exerce função na regulação do peso corporal (ROTHWELL e STOCK, 1979), pois a sua ativação poderia aumentar significativamente o gasto energético. Este aumento do gasto energético tecidual se elevaria consideravelmente durante a estimulação noradrenérgica, que se dá, sobretudo, por meio de receptores beta-3 (CANNON e NEDERGAARD, 2004), o que promove uma maior captação periférica de glicose e ácidos graxos, aumentando assim a capacidade de demanda energética a este tecido e conferindo também um papel regulatório na homeostase da glicose (ORAVA et al., 2011; PEIRCE et al., 2014).

O tecido adiposo bege (TABg) se localiza nas regiões cervical, supraclavicular, axilar e paravetrebral (NEDERGAARD *et al.*, 2007). Evidências revelaram que se trata de um subconjunto de TAB, com fenótipo intermediário e características adaptativas do TAM (HARMS e SEALE, 2013). Responde a estímulos como exposição ao frio, aumentando rapidamente a expressão de genes que codificam as proteínas essenciais à termogênese (PEIRCE *et al.*, 2014).

Neste contexto, a proteína desacopladora 1 (UCP-1) é essencial para aumentar a oxidação de ácidos graxos não acoplada à síntese de ATP, consequentemente, aumenta a geração de calor (WU et al., 2013). Os níveis de UCP-1 são baixos no TAB e no TABg, mas o TABg tem notável capacidade de

elevar a expressão de UCP-1, promovendo aumento da termogênese, se assemelhando ao TAM. Esta alteração é promovida por vários hormônios, dentre eles a irisina, um hormônio liberado pelos músculos durante atividade física (BOSTROM *et al.*, 2012).

A adiposopatia está intimamente associada à fisiopatologia da síndrome metabólica (SM). Há evidências robustas de que as alterações imuno-inflamatórias emergem e se exacerbam pelo acúmulo de TAB. Além disso alguns mecanismos existentes no estado de obesidade como: hipóxia, estresse do retículo endoplasmático, lipotoxicidade e endotoxemia metabólica, foram propostos como fatores que possuem papel central no desenvolvimento alterações presentes nesta patologia (GE et al., 2014). Configurando assim elementos importantes de ligação entre estas duas patologias, obesidade e SM (MAURY e BRICHAD, 2010; LUMENG et al., 2011).

A SM é descrita como um conjunto de fatores de risco para DCV cardiovascular e diabetes que estão intimamente relacionados. Dentre os critérios para o diagnóstico de SM, estão níveis pressóricos elevados, níveis de HDL colesterol diminuídos e triglicerídeos elevados, disglicemia e adiposidade central (ALBERTI *et al.*, 2009).

## 1.3 Obesidade e comorbidades

### 1.3.1 Resistência à insulina e DM2

A obesidade foi reconhecida como um fator importante e facilitador para o desenvolvimento não só de HA como também de DM2 e estas as patologias estão intimamente relacionadas ao aumento da resistência à insulina (RI), além de constituírem um dos maiores fatores de risco para doenças cardiovasculares (LUKIC et al., 2014).

A insulina exerce diversas funções fisiológicas e a redução dos níveis de glicose caracteriza sua função primária. A insulina promove a síntese de ácidos graxos e glicogênio, estimula a atividade mitocondrial e a proliferação celular, além de melhoar a microcirculação (He *et al.*, 2011). A resistência à insulina é caracterizada por uma falha na via de sinalização da insulina, em que a captação de glicose por meio da insulina é prejudicada no tecido sensível à insulina. Este

.

mecanismo pode levar à hiperinsulinema de modo que as células β das ilhotas pancreáticas sintetizem uma quantidade elevada de insulina com o intuito de controlar os níveis glicêmicos (Ye, 2013).

Diversos fatores foram postulados para explicar o fenômeno de RI, entre os quais se inserem: obesidade, inflamação, disfunção mitocondrial, hiperlipidemia, lipotoxicidade, estresse do retículo endoplasmático, esteatose hepática, hipóxia e hiperinsulinemia. A RI é um dos fatores principais para o desenvolvimento de DM2 (Ye, 2013).

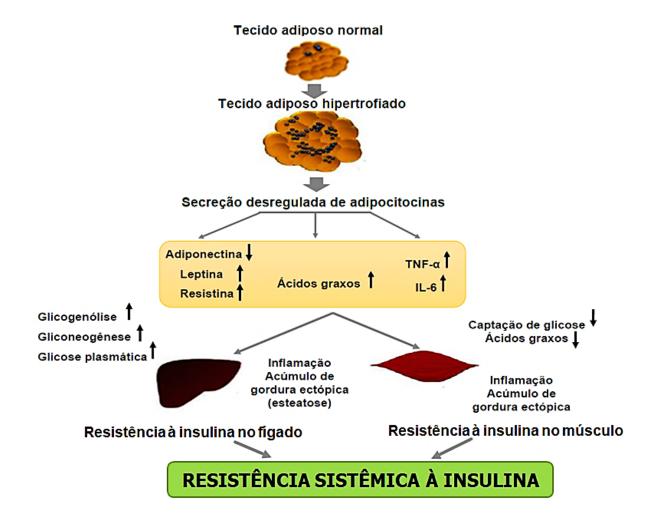
A RI na obesidade ocorre pela diminuição no mecanismo de transporte e do metabolismo da glicose, que recebe estímulo da insulina das células adiposas e do músculo esquelético, e pelo aumento da produção de glicose pela via hepática (KAHN e FLIER, 2000). Em modelos de sensibilidade à insulina, a RI assumiu características tais como: aumento da hemoglobina glicosilada, hiperlipidemia, diminuição da tolerância a glicose e insulina, hiperinsulinemia e hiperglicemia em jejum, hiperglicemia pós-prandial, mecanismos que estão associados a fisiopatologia do DM2 (ZHUO et al., 2018).

No metabolismo da glicose, a insulina tem como tecidos alvo: o muscular, o hepático, ósseo e adiposo. As respostas desses tecidos à insulina e outros hormônios estabelecem concentrações de glicose, ácidos graxos e outros metabólitos no plasma (DIMITRIADIS *et al.*,2011). Os níveis glicêmicos são estabelecidos, sobretudo pelo equilíbrio hepático e a ação da insulina. Ocorre inibição da produção de glicose no fígado e estímulo à absorção de glicose pelo músculo (RUI, 2014). Em relação ao tecido adiposo, a insulina estimula a absorção e estocagem de ácidos graxos em forma de triglicerídeos, inibindo a lipólise (SCHENK *et al.*, 2008; OLEFSKY e GLASS, 2010; STUMVOL *et al.*,2005).

Evidências indicam que o DM2 possui relação com a inflamação (LONTCHI-YIMAGOU et al., 2013), fenômeno presente na RI deflagrada pela obesidade (OLEFSKY e GLASS, 2010), como já mencionada é caracterizada pelo acúmlo de TAB, que é considerado o principal facilitador da inflamação sistêmica (ODEGAARD e CHAWLA, 2013) (Figura 4). Este tecido, tem como c Neste mecanismo ocorre o recrutamento de um grande número de macrófagos e células T para o adipócito branco,o que ativa a cascata inflamatória e promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias (WANG et al., 2008), alterando

estrutura e função dessas células, tendo como produto final distúrbios metabólicos e resistência sistêmica à insulina (LEE *et al.*, 2011). O prolongamento da cascata inflamatória, induz a ativação de diversos mecanismos de estresse celular, prejudicando a função celular (HOTAMISLIGIL 2006; GREGOR e HOTAMISLIGIL, 2011).

Figura 4. Mecanismos que levam resistência à insulina a partir da hipertrofia dos adipócitos. A hipertrofia do tecido adiposo na obesidade é caracterizada pelo recrutamento de macrófagos que promoverá a secreção desregulada de adipocinas como o aumento dos níveis de leptina e resisistina e diminuição dos níveis de adiponectina, além do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias. Estes mecanismos levarão ao aumento da glicogenólise, gliconeogênese e glicose plasmática; e redução na captação de glicose, oxidação de ácidos graxos, resultando em inflamação local no fígado e tecido muscular que em conjunto promoverão a resistência sistêmica á insulina. Adaptada de Galic *et al., In Mol Cell Endocrinol 2010.* 



Diversos estudos evidenciam que o ganho de peso corporal constitui fator de risco importante para o desenvolvimento de HA (KOTSIS *et al.*, 2010; STEPIEN *et al.*, 2014) e que cada 5% de ganho no peso corporal, aumentava-se em 20-30% o risco desta patologia (DROYVOLD *et al.*, 2005). Além disto, o estudo do *Trials of Hypertension Prevention*, que avaliou os efeitos da perda de peso em indivíduos com sobrepeso e obesidade, incluídos em um programa de 3 anos de dieta e atividade física, demonstrou que nas fases II e III as variações de peso têm relação linear com a pressão arterial (PA). Em média, uma perda de 8 kg estava associada com redução de 7 mmHg na pressão diastólica e 5 mmHg na pressão sistólica. Em contrapartida, aqueles que voltaram ao peso inicial exibiram novamente níveis pressóricos elevados (STEVENS *et al.*, 2001).

Os mecanismos fisiopatológicos ligando obesidade à HA incluem fatores nutricionais, metabólicos, disfunção endotelial e vascular, hiperatividade nervosa simpática, retenção de sódio e inadequação de respostas imuno-inflamatórias (ESLER et al., 2006; ZHAO et al., 2011). Ao mesmo tempo, o tecido adiposo visceral resistente à insulina e à leptina passa a constituir uma fonte de secreção inapropriada de moléculas e hormônios, tais como adiponectina, leptina, resistina, TNF e IL-6 que exacerbam a doença cardiovascular associada à obesidade (CELORIA et al., 2010; RYAN et al., 2013). Há também, evidências que sugerem que o microbioma intestinal desempenha papel relevante na modulação desses mecanismos (HARRIS et al., 2012).

Na obesidade, ocorre o aumento da atividade simpática, característica observada tanto em humanos como em modelos animais, leva a uma hiperatividade do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) (RAHMOUNI et al., 2005), que tem como funções realizar o controle homeostático da pressão arterial, perfusão tecidual e volume extracelular (STEVEN, 2007). A ativação desse sistema relacionado à obesidade promoverá a elevação da pressão arterial devido à vasoconstricção periférica e ao aumento da reabsorção de sódio nos túbulos proximais e distais renais (RAHMOUNI et al., 2005). Todos os componentes do SRAA estão presentes no tecido adiposo, tais como os receptores funcionais de renina, que podem ter correlação com a regulação do acúmulo do tecido adiposo e a adiposidade visceral (ACHARD et al., 2007).

Há evidências que modificações epigenéticas podem ser uma das causas moleculares entre fatores ambientais para o aparecimento do DM2; alguns indivíduos podem estar predispostos ao fenótipo diabético devido aos mecanismos epigenéticos. Contudo, a homeostase alterada no DM2, como a hiperglicemia crônica, dislipidemia e aumento do estresse oxidativo, pode ser considerada responsável pelas alterações epigenéticas, levando ao desenvolvimento dos efeitos deletérios da doença (LING e GROOP, 2009).

## 1.4 A obesidade e os miRNAs

Os miRNAs constituem uma classe altamente conservada evolutivamente de pequenos RNAs endógenos (18-22 nucleotídeos) não codificantes que foram identificados por Victor Ambros e colaboradores em 1993 (LEE et al., 1993; WIGHTMAN et al., 1993; AMBROS et al., 2003). As primeiras funções descobertas foram a atuação como silenciadores pós-transcricionais, na degradação de RNAs mensageiros (mRNA) e inibição da tradução de mRNAs específicos (BARTEL, 2004; CULLEN, 2004).

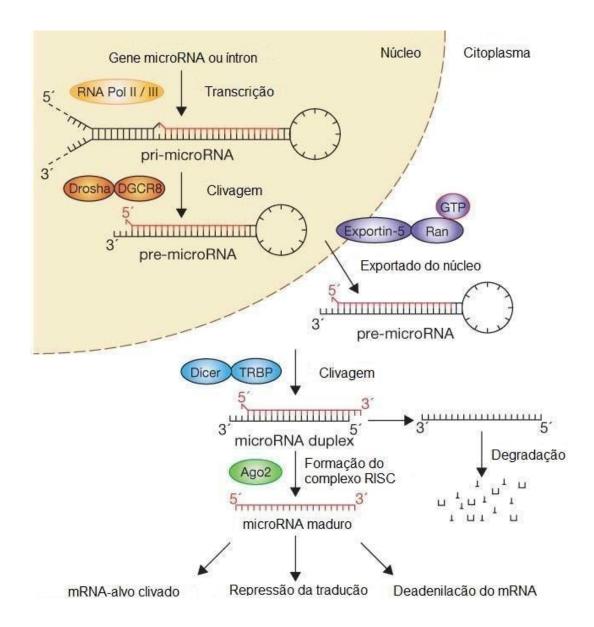
A maioria das células eucarióticas possuem estas moléculas, e estima-se que mais de 60% da expressão dos genes de mamíferos podem sofrer a ação dos miRNAs (FRIEDMAN *et al.*,2009). Portanto, como já descrito, estão envolvidos em diversos processos biológicos e na fisiopatologia de doenças em humanos (KLOOSTERMAN e PLASTERK., 2006; STEFANI e SLACK, 2008). Wu e colaboradores (2006) sugeriram que os miRNAs podem controlar a expressão gênica por meio de dois mecanismos: pelo pareamento incompleto de bases com a região 3'- não traduzida (3'- *untranslated region*) do mRNA devido à diminuição da eficiência de sua tradução, ou permitindo a deanilação deste do mRNA, levando à sua degradação por meio de exonucleases.

Análises de bioinformática indicam que um único miRNA pode inibir a expressão de diversos mRNAs, e por outro lado, um mesmo mRNA pode ser inibido por diversos miRNAs. Isto demonstra que estas moléculas apresentam um enorme potencial regulatório e que são capazes de influenciar múltiplas vias de sinalização em diferentes tecidos (KOZOMARA et al., 2011). A biogênese dos miRNAs consiste em uma série de etapas a partir da transcrição de genes pertencentes a uma família altamente conservada evolutivamente, que podem

estar situados em íntrons ou éxons ou ainda em regiões intergênicas dos genes codificadores de proteínas (RODRIGUEZ *et al.*, 2004).

A formação dos miRNAs tem origem no núcleo celular, em sua maioria mediada pela transcrição da RNA Polimerase II, gerando uma molécula primária (pri-miRNA), que após clivagem é exportada para o citoplasma, onde sofre uma segunda clivagem, resultando em um *duplex* de miRNAs maduros, que se ligará ao complexo *de* silenciamento induzido por RNA (RISC). Uma vez incoporada ao complexo RISC, esta molécula torna-se apta a realizar a inibição da tradução ou promover a degradação do mRNA alvo. A complementariedade entre os miRNAs maduros e o mRNA resultará na clivagem do mRNA ou inibição traducional (Figura 5) (ZHANG et al., 2007; DALMAY, 2008; SCHMITTGEN, 2008).

Figura 5. Biogênese dos miRNAs. A transcrição inciada no núcleo da célula pela RNA Polimerase II ou III dá origem ao precursor primário, o pri-miRNA em formato de *hairpin* que é clivado ainda no núcleo pelo complexo nuclear composto pela ribonuclease III DROSHA e seu cofator DGCR8, que dá origem a molécula precursora, o pré-miRNA. O pré-miRNA é ativamente exportado para o citoplasma pela Exportina-5, onde é liberado através da hidrólise de GTP e é clivado pela ribonuclease III DICER e seu cofator TRBP, dando origem a uma fita dupla de miRNAs maduros. Apenas uma das fitas do miRNA maduro é incorporada ao complexo RISC, que contém as proteínas Argonautas e a outra fita é degradada. A escolha da fita que será ativa é dependente da conformação do dupléx, de nucleotídeos presentes na extremidade 5' e da assimetria termodinâmica. Adaptada de Winter *et al in Nature Cell Biology*, 2009.



Dentro dos miRNAs maduros, a sequência de nucleotídeos 2-7 dá origem a uma região denominada semente ou "seed region" na região 5', que estabelece qual será o alvo do mRNA que o miRNA se conectará. O grau de complementariedade da região semente pode ser comparada aos sítios de DNA

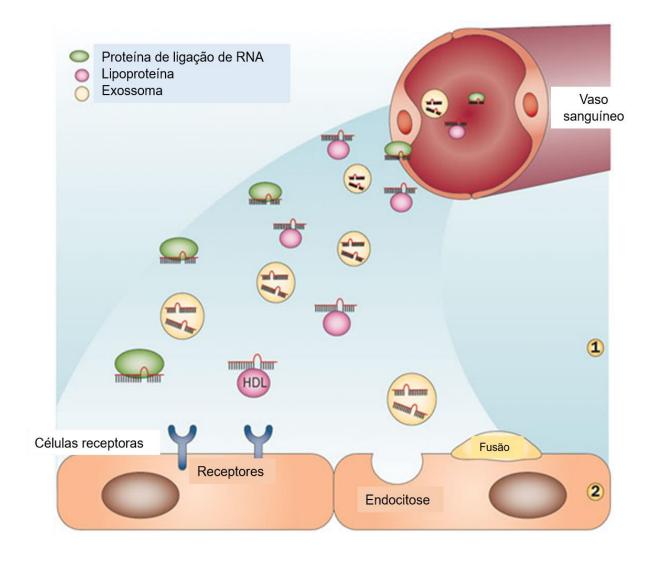
reconhecidos por fatores de transcrição, pois de modo semelhante a estes, os miRNAs podem se ligar a diversos sítios complementares, mais comumente na 3'-UTR dos seus mRNA alvos (BARTEL, 2009; ELLWANGER *et al.*, 2011).

Os alvos funcionais de miRNAs em modelos animais estão principalmente ligados à 3'-UTR, porém também foram encontrados sítios alvos dessas moléculas na 5'-UTR e em *open reading frams* (*ORFs*). No entanto, esses locais não são muito frequentes e são pouco eficazes quando comparados à 3'-UTR (FARH *et al.*, 2005; LEWIS *et al.*, 2005; LIM *et al.*, 2005). Em contrapartida, a 5'-UTR do mRNA, representa a região em que o códon que inicia a tradução está localizado (DAVULURI, *et al.*, 2000).

Os miRNAs além de modular a tradução proteica celular, podem também ser encontrados no meio extracelular, ou seja, podem se apresentar circulantes no sangue e em outros fluidos corporais, podendo estar associados a proteínas, microvesículas ou a complexos de lipoproteínas (VICKERS *et al.*, 2011).

O papel dos miRNAs circulantes ainda não está bem estabelecido, porém estudos demonstraram que os miRNAs transmitidos por exossomos ou proteínas HDL. Podem atuar nos receptores de outras células, sugerindo o envolvimento dessas moléculas na comunicação intercelular **(Figura 6)** (VICKERS *et al.*, 2011; VALADI *et al.*, 2007; ARROYO *et al.*, 2011; GIBBINGS *et al.*, 2009).

**Figura 6. Transporte extracelular dos miRNAS**. Os miRNAs são liberados pelas células, podendo ser encontrados sob a forma estável nos fluidos. Estas moléculas podem estar associadas às proteínas argonautas, às partículas de HDL ou podem ser transportadas em vesículas como os exossomos. Adaptado de Guay e Regazzi (2013).



Os primeiros achados de miRNAs no soro, revelaram que os pacientes portadores de Linfoma de células B apresentavam níveis de expressões de miRNAs mais elevados que os indivíduos saudáveis incluídos no estudo (LAWRIE et al., 2008). No mesmo ano, foi realizado o primeiro estudo descritivo de miRNAs circulantes em sangue de humanos através da análise por Reação em Cadeia Polimerase em Tempo Real (qPCR), utilizando plasma obtido da placenta de gestantes. A análise possibilitou não só a caracterização física e a estabilidade, mas também atribuir aos miRNAs, o seu emprego como uma nova ferramenta para a monitorização de pacientes (CHIM et al., 2008).

Os miRNAs maduros encontrados no interior das células, possuem uma meia-vida notavelmente longa, e no meio extracelular são altamente estáveis e

resistentes a degradação (LI *et al.*, 2013; RÜEGGER *et al.*, 2012; MARZI *et al.*, 2016; GANTIER *et al.*, 2011). Isto se deve á associação destas moléculas maduras às proteínas argonautas, pois não havendo essa incorporação, os miRNAs sofreriam rápida degradação em compartimentos ricos em RNAses (NELSON *et al*, 2004; MITCHELL *et al.*, 2008).

No soro, especificamente, são consideravelmente estáveis por períodos prolongados e isto pode ser explicado pela ocorrência de dois mecanismos. O primeiro é explicado pela formação do complexo ribonucleoprotéico em conjunto com as proteínas Argonautas 2 e/ou pela incorporação aos exossomos (LI *et al.*, 2012). Outro fato é a presença de ribonucleases no soro. Acredita-se que não exista qualquer RNA preservado neste fluido, indicando que os miRNAs presentes no soro sejam resistentes a ação das RNAses. Todas essas propriedades conferem a estas moléculas características únicas, tais como: resistência mediante a variações extremas de pH e temperatura, ciclos repetidos de congelamento e descongelamento e estocagem por longos períodos sem que haja degradação (CHEN *et al.*, 2008).

Embora autores tenham descrito que o plasma representa a fração de sangue sem células sanguíneas (KROH *et al.*, 2010), dados revelaram que no plasma, há um contato considerável entre plasma e células sanguíneas. Fato que pode ser explicado por duas hipóteses: miRNAs circulantes contidos no plasma podem ser alterados por pequenas perturbações nas células sanguíneas, podendo resultar em hemólise e níveis de expressão elevados de miRNAs em células sanguíneas (PRITCHARD *et al.*, 2012). Além disto, um outro ponto a ser discutido é a contaminação por plaquetas. Mitchell e colaboradores (2016), interessados em investigar se haveria contaminação de plaquetas em relação aos miRNAs circulantes, utilizaram plasma armazenado com resíduos de plaquetas. Após terem congelado e descongelado este material, observaram que houve uma liberação considerável de miRNAs e pequenas partículas de plaquetas, que estariam contaminando a população de miRNAs circulantes.

Mitchell e colaboradores (2008), compararam amostras de soro e plasma de doadores saudáveis e pacientes com câncer de próstata, e verificaram a existência de uma forte correlação entre os quatro miRNAs analisados, dentre os quais estavam: miR-15b, miR-16, miR-19b e miR-24, indicando que tanto soro e plasma são aceitáveis como materiais para a análise de miRNAS como

biomarcadores no sangue. Contudo, os perfis de miRNAs podem apresentar níveis de expressão distintos, devido diferenças na composição destes dois fluidos corporais (MARINER *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2012; WILLEIT *et al.*, 2013).

O plasma é rico em proteínas, em que células brancas, vermelhas e plaquetas, ficam suspensas, já o soro é o fluido obtido após a retirada do coágulo formado. O soro teria composição semelhante ao plasma se não fosse a ausência de fibrinogênio e dos fatores de coagulação (GONZALEZ-QUINTELA et al., 2008). O plasma, é a fração de sangue coletada na presença de anticoagulantes e que após centrifugações é obtido o sobrenadante que não possui células sanguíneas. Diferente do soro que é produto da centrifugação do sangue coletado sem coagulante e que a coagulação espontânea foi permitida (KROH et al., 2010).

As análises do perfil de miRNAs circulantes nestes dois fluidos realizadas por Wang e colaboradores (2010), em que soro e plasma foram coletados do mesmo paciente concomitantemente, evidenciaram uma concentração mais elevada destas moléculas no soro. O estudo também sugere que em devido ao processo de lise das células, durante o processo de coagulação há a liberação de miRNAs, o que pode sugerir a diferença de concentração de miRNAs entre estes dois fluidos. Contudo, os autores verificaram ainda que certos tipos de miRNAs que são altamente expressos em eritrócitos, leucócitos e plaquetas, não apresentaram diferença de concentração entre soro e plasma.

O fato dos miRNAs circulantes poderem ser obtidos através de métodos menos invasivos dos mais diferentes fluidos biológicos, tais como saliva, urina, líquido amniótico, leite materno, além do sangue periférico, faz com que estas moléculas sejam apontadas como candidatos potenciais a biomarcadores nos mais variados tipos de doença (WEBER et al., 2010). Evidências têm atribuído a estas moléculas um grande potencial para se tornarem biomarcadores para diagnóstico precoce, prognóstico e também alvos de intervenções terapêuticas em obesidade e suas complicações cardiometabólicas (VILLARD et al., 2015).

O papel dos miRNAs na adipogênese em diferentes espécies já está estabelecido (HILTON et al., 2013; ROMÃO et al., 2012) e padrões de expressão alterada de miRNAs têm sido relacionados com obesidade e diabetes (HENEGHAN et al., 2011; KLOTING et al., 2009). Evidências recentes apontam

o importante papel dos miRNAs como moduladores do processo inflamatório no TAB, regulando a imunidade inata e a adaptativa (SCHÄFFLER *et al.*, 2010). Além disto, microvesículas contendo miRNAs podem ser liberadas do tecido adiposo para a circulação ou células vizinhas, mediando a comunicação intercelular (OGAWA *et al.*, 2010).

Análises com miRNAs circulantes em soro e plasma demonstraram que a expressão alterada de alguns miRNAs (miR-138, miR-376a, miR-15b, miR-126, miR-132, miR-17-5p, miR-103-3p e miR-375-3p) estaria associada com diversas alterações como SM, obesidade, doenças coronarianas, DM1 e DM2 (PESCADOR et al., 2013; ZAMPETAKI et al., 2010; HENEGHAN et al., 2011; ORTEGA et al., 2013; KAROLINA et al., 2012; FICHTLSCHERER et al., 2010; HSIEH et al., 2015; XU et al., 2015; SEYHAN et al., 2016).

## 1.4.1 miR-17-5p

No DNA, o *cluster* miR-17~92 está localizado no cromossomo 13q31.3 e é precursor de uma família de miRNAs que inclui o miR-17-5p, o miR-20a/b, miR-93 e miR-106a/b (<a href="http://www.mirbase.org">http://www.mirbase.org</a>). Este *cluster* encontra-se altamente expresso em células embrionárias, revelando, assim, sua importante função no desenvolvimento (VENTURA *et al.*, 2008). Foi a primeira família de miRNAs a ter sua participação reconhecida no desenvolvimento de síndromes humanas, como por exemplo, a Síndrome de *Feingold*, em que foi demonstrada a sua importância no desenvolvimento normal do esqueleto (MARCELIS *et al.*, 2008).

Nas células do sistema imune, o cluster miR-17~92 possui uma série de atribuições essenciais. Está relacionado ao desenvolvimento normal dos linfócitos, estimula a proliferação de células B e as protege da morte, contribui para a produção de interferon- y (INF- y) e na diferenciação das células T(Jiang et al., 2011). Seu envolvimento no câncer já foi bem estabelecido e reconhecido, assim como em diversas desordens neurodegenerativas, cardiovasculares e imunológicas (TAGANOV et al., 2007; TSITSIOU e LINDSAY, 2009; SMALL et al., 2010).

A superexpressão do *cluster* miR-17~92 foi descrita no tecido endotelial (SUARÉZ *et al.*,2008); e na doença arterial coronariana já foi observada uma

redução na expressão deste miRNA (BONAUER *et al.*, 2009; FICHTLSCHERER *et al.*, 2010). A redução na expressão de miR-17 foi demonstrada em soro de animais portadores de obesidade induzida por dieta (HSIEH *et al.*, 2015) e em indivíduos com SM, DM2 e Hipercolesterolemia (KAROLINA et al., 2012), indicando a importância deste miRNA como candidato a biomarcador em diferentes tipos de doença.

Ensaios *in vitro* revelaram o envolvimento de miR-17 na adipogênese (LI *et al.*,2013) em células tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo. Os autores daquele estudo realizaram a transfecção de mímico de miR-17 e observaram que quando este mímico foi adicionado a esta cultura de células, o processo adipogêncico era acentuado. Dentre as vias de sinalização do miR-17-5p está a via de TGF-β (*Transforming Growth Factor- Beta*, que regula importantes funções celulares e exerce um papel importante em doenças metabólicas como o DM2 (ROJAS *et al.*, 2009; DHAWAN *et al.*, 2016).

### 1.4.2 miR-103-3p

Este miRNA pertence à família miR-103/107 e está localizado na região cromossômica 5q34. Apresenta uma expressão alterada em diferentes doenças metabólicas (http://www.mirbase.org). Em pacientes com insuficiência cardíaca miR-103-3p exibe níveis muito baixos quando comparados aos seus controles saudáveis, sendo considerado um bom preditivo de diagnóstico (ELLIS et al., 2013). Além disto, sugeriu-se que a modulação dos níveis de expressão deste miRNA, representa uma boa ferramenta terapêutica para patologias que estão associadas ao estresse oxidativo, pois seu envolvimento com inflamação também foi observado (ZHANG et al., 2018; XU et al., 2015).

Análises computacionais revelaram que esta família apresenta diferentes níveis de expressão durante o desenvolvimento, na proliferação celular, oncogênese, nas diferentes formas de resposta ao estresse relacionado à temperatura e hipóxia (BASKERVILLE *et al.*, 2005; MARSIT *et al.*, 2006). Na apoptose mediada pelo estresse oxidativo do reticulo endoplasmático (RE), sua participação foi associada à acentuação do processo apoptótico. A expressão de

miR-103 foi observada em diferentes órgãos, mas em maior concentração no tecido cerebral (ZHANG *et al.*, 2018; MONCINI *et al.*, 2011).

Além disto, miR-103 atua como regulador dos genes associados ao metabolismo de lipídeos (*KAROLINA et al.*, 2012). No processo adipogênico, sua função também foi demonstrada, sendo que apresenta níveis mais elevados na fase de diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros. Sua expressão ectópica é elevada durante a adipogênese enquanto que na obesidade, apresenta níveis mais baixos (XIE *et al.*, 2009). A participação deste miRNA na diferenciação de pré-adipócitos em células da linhagem 3T3-L1 foi demonstrado através da ativação da via de AKT/mTOR. Esta via que exerce um papel crítico na inflamação, obesidade e diabetes (SAKAGUCHI *et al.*, 2006).

Trajkovski e colaboradores (2011) identificaram a expressão de miR-103 alterada no DM2; em contrapartida, o seu silenciamento, promoveu o aumento da sensibilidade à insulina no tecido adiposo e no fígado. Ainda neste estudo, os autores demonstraram que a *caveolina 1*, um regulador crítico do receptor de insulina, constituía-se como alvo de miR-103. Um aumento na expressão de miR-103 foi observado no soro de pacientes portadores de Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA) e foi positivamente correlacionado com o HOMA-IR, triglicerídeos e IMC (XU et al., 2015). Por outro lado, a redução na expressão de miR-103 foi observada no plasma de gestantes obesas (CARRERAS-BADOSA et al., 2015). Até o momento não existe associação entre os níveis de expressão de miR-103 em amostras de soro e dados antropométricos, como por exemplo, a circunferência de cintura.

# 1.4.3. miR-375-3p

miR-375 está localizado no cromossomo 2q35 (<a href="http://www.mirbase.org">http://www.mirbase.org</a>), e está relacionado a fisiopatologia do Diabetes Mellitus. Hinton e colaboradores (2012) demonstraram que a participação deste miRNA não está restrita apenas ao estágio inicial de desenvolvimento de células-tronco embrionárias pertencentes a linhagem madura de células endócrinas, mas também está implicada na função das ilhotas pancreáticas.

Este miRNA é expresso abundantemente no pâncreas, estando envolvido com a proliferação das células β-pancreáticas (POY *et al.*, 2009), atuando de forma direta sobre a miotrofina (Mtpn), proteína citoplasmática envolvida na exocitose de grânulos de insulina, que medeia a secreção de glucagon e insulina nestas células (POY *et al.*, 2009). Foi desmonstrado que a quinase 1 dependente de 3-fosfoinositídeo (PDK-1), um mediador cuja função é fundamental para a transdução do sinal da insulina, que promove a fosforilação e ativação das proteínas quinase, que são essenciais para diversos processos celulares (PRIMO *et al.*, 2007)

Análises com modelos animais demonstraram que os níveis circulantes de miR-375 provavelmente não estariam relacionados com a função das células β-pancreáticas, mas sim com a presença de injúria nestas células ou com a morte celular (LATREILLE et al., 2015). Um estudo piloto que avaliou os níveis de miRNAs no plasma de indivíduos com pré-diabetes, DM1 e DM2, demonstrou um aumento na expressão de miR-375 em indivíduos com DM1 (SEYHAN *et al.*, 2016).

Além disto, este miRNA foi associado à diferenciação adipogênica, pois o aumento de fatores de transcrição como C / EBPα, PPARγ e do adipócito FABP (aP2) foram positivamente relacionados à hiperexpressão do miR-375 (LING *et al.*, 2011). O aumento de gotículas de gordura foi associado à expressão desta molécula nas células da linhagem 3T3-L1.

#### **2 JUSTIFICATIVA**

A obesidade, principalmente a abdominal, está relacionada a um maior risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular (DCV) e DM2 (OHLSON et al., 1985; REXRODE et al., 1998). Entre as suas prioridades, a OMS colocou recentemente, o planejamento de ações globais voltadas para a redução da crescente prevalência de indivíduos portadores de obesidade e DM2 (SWINBURN et al., 2015). O DM2 está também entre as causas mais importantes de cequeira e amputação e é a única causa em ascensão para insuficiência renal crônica (IRC) (WANNER et al., 2015). Pesquisas demonstram que, além do fator genético, alterações epigenéticas, como a atividade de miRNAs, estão estreitamente relacionadas com a obesidade. Os estudos com miRNAs como biomarcadores diagnósticos e de evolução prognóstica se situam na fronteira do conhecimento contemporâneo na área de obesidade e comorbidades. Os miRNAs circulantes apontam como potenciais biomarcadores em diversas doenças, em virtude da facilidade de obtenção e por representarem uma forma de comunicação celular. A correlação entre a expressão destas moléculas circulantes com dados antropométricos e bioquímicos de pacientes obesos e com sobrepeso comparados com os de peso normal poderá elucidar interações entre importantes sistemas envolvidos nos complexos mecanismos etiopatogênicos da obesidade e suas complicações cardiometabólicas tais como o DM2 e HA.

#### **3 OBJETIVOS**

# 3.1. Objetivo geral

Este estudo teve por objetivo avaliar a expressão de miRNAs relacionados com a obesidade e suas comorbidades e associar esta expressão com dados antropométricos IMC, CC, CQ e RCQ, bioquímicos em adultos de 20 a 45 anos, classificados de acordo com o IMC.

# 3.2. Objetivos específicos

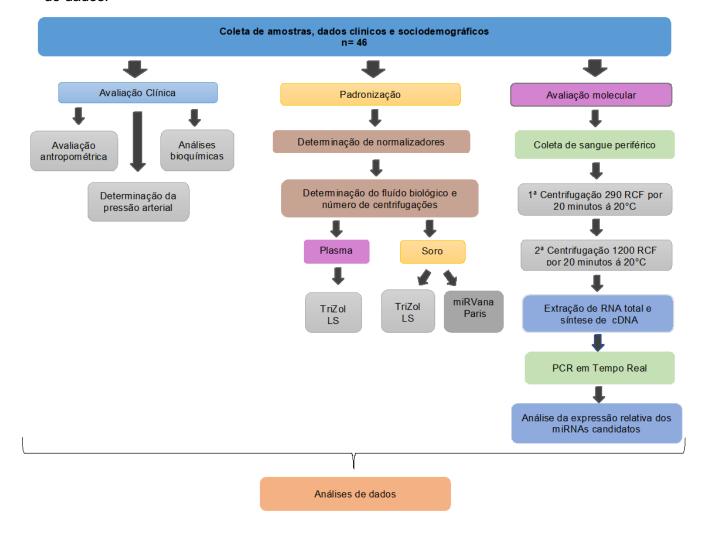
- Avaliar os dados antropométricos, os níveis pressóricos e determinar o perfil bioquímico de indivíduos com peso normal, com sobrepeso e obesos;
- Avaliar os níveis circulantes de miR-17-5p, miR-103-3p e miR-375-3p nestes mesmos indivíduos;
- Avaliar a existência de associação entre a expressão dos miRNAs com os dados obtidos a partir das medidas antropométricas, pressão arterial e o perfil bioquímico.

#### **4 METODOLOGIA**

#### 4.1 Desenho do Estudo

Para a melhor compreensão da metodologia utilizada neste estudo, o fluxograma (**Figura 7**) abaixo descreve as etapas clínicas e moleculares empregadas neste estudo.

**Figura 7- Resumo das abordagens técnicas utilizadas no estudo**. Etapa clínica, padronização do protocolo de extração de miRNAs circulanres, avaliação molecular e análise de dados.



#### 4.2 Casuística

A população do estudo foi composta por uma amostra de conveniência, constituída por 46 indivíduos adultos jovens (20 a 45 anos, recrutados entre funcionários e alunos da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO). Estes indivíduos foram separados em três grupos distintos: peso normal/grupo controle (IMC entre 18.5 ≤ IMC ≤ 24.9kg/m²), grupo sobrepeso (IMC entre 25 kg/m² e 29,9 kg/m²) e grupo obeso (IMC igual ou superior a 30 kg/m²). Os indivíduos se habilitaram voluntariamente, e foram incluídos no estudo a partir dos critérios de inclusão e exclusão descritos a seguir.

Antes dos procedimentos, os indivíduos foram esclarecidos a respeito de todas as abordagens necessárias para a pesquisa. Após leitura e concordância dos itens expostos no documento, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO I). Posteriormente a assinatura deste termo, os voluntários foram submetidos à anamnese contendo os dados sociodemográficos e clínicos e a coleta de sangue periférico (ANEXO II).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), com o parecer de nº1.359.083 (ANEXO III).

Para uma melhor seleção dos participantes deste estudo, foram adotados os seguintes critérios de inclusão e exclusão.

#### Critérios de Inclusão:

- Idade de 20 a 45 anos, sem distinção de sexo e etnia;
- Ser capaz de ler, compreender e assinar o TCLE.

#### Critérios de Exclusão:

Foram excluídos deste estudo, os indivíduos que apresentavam as seguintes condições:

- Intolerância à glicose ou DM2;
- Nefropatias, endocrinopatias, neoplasias;
- Doenças cardiovasculares, autoimune, hematológica, psiquiátrica e intestinal;

- Uso de fármacos que interferem no peso corporal, metabolismo de carboidratos e lipídeos e hipotensores
- Gestação, lactação;
- Uso de substâncias ilícitas;
- Etilismo e tabagismo.

# 4.3 Medidas Antropométricas

As medidas antropométricas abrangem parâmetros essenciais para o conhecimento do estado nutricional de cada indivíduo. Para este estudo, foi utilizado o IMC, circunferência de cintura, circunferência de quadril e relação cintura-quadril.

# - Índice de Massa Corporal- IMC

Este índice é determinado pela equação em que o peso (em kg) é dividido pela altura ao quadrado (em m²). Esta medida foi determinada através de equipamentos adequados como a balança antropométrica e estadiômetro. A balança antropométrica mecânica da marca Balmak® (BALMAK, Santa Bárbara do Oeste, Brasil) encontrava-se apoiada em uma superfície plana e lisa. Os indivíduos estavam em jejum, na posição ortostática, trajando roupas leves e descalças, posicionados na parte central da balança. A altura foi obtida por meio do estadiômetro.

- Circunferência de cintura, circunferência de quadril e relação cinturaquadril.

A circunferência de cintura (CC) e circunferência de quadril (CQ), foram mensuradas com fita métrica metálica, graduada em centímetros com o paciente na posição ortostática. Para a primeira medida, utilizou-se o ponto médio entre a crista ilíaca e o último arco costal; na segunda medida (CQ), a maior circunferência posterior das nádegas. A relação cintura-quadril (RCQ) foi obtida através da divisão da CC pela CQ.

# 4. 4 Determinação da Pressão Arterial (P. A.)

A pressão arterial foi aferida por método oscilométrico, utilizando-se um monitor automático da OMRON. O tamanho dos manguitos estava adequado ao braço dos participantes e os registros foram feitos com o indivíduo sentado. Após sua chegada para avaliação, o paciente permanecia em repouso durante 10 a 15 minutos. As primeiras aferições foram realizadas em ambos os braços, tanto no direito como no esquerdo, considerou-se esta medida como o descarte. Após esta primeira abordagem, fazia-se uma pausa de 5 minutos para a realização das três medidas sequenciais com intervalos de 3-5 minutos, com vistas ao cálculo da média dos níveis pressóricos. Valores que apresentaram diferenças acima de 10 mmHg e 5 mmHg para pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD), respectivamente, foram descartados. Para o cálculo da pressão arterial média (P.A. M.) foi utilizado o cálculo, no qual o dobro da P.A. diastólica foi somado a média da P.A. sistólica, e o resultado dividido por três.

Os valores de referência utilizados para determinar o perfil pressórico dos indivíduos deste estudo, foram baseados nos valores da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC, 2017), que classifica: pressão arterial normal: PAS  $\leq$  120 mmHg e PAD  $\leq$  80 mmHg; pré-hipertensão: PAS 121-139 mmHg e PAD 81-89 mmHg; hipertensão estágio I: PAS 140 – 159 e PAD 90 – 99 mmHg; hipertensão estágio II: PAS 160 – 179 mmHg e PAD 100 – 109 mmHg e hipertensão estágio III: PAS  $\geq$  180 mmHg e PAD  $\geq$  110 mmHg.

#### 4.5 Ensaios Bioquímicos

Foram coletados aproximadamente 10 mL de sangue periférico após 12h de jejum para realização das análises bioquímicas e moleculares. As análises bioquímicas foram feitas em parceria com o LABORAFE – Laboratório de Análises Clinicas da Unigranrio. Dentre as análises bioquímicas foram avaliadas:

- Glicemia de Jejum: pelo método enzimático, amostra coletada em tubos sem anticoagulantes, centrifugadas imediatamente após a coleta. Valores expressos em mg/dL e baseados nos valores de referência fixados pela

.

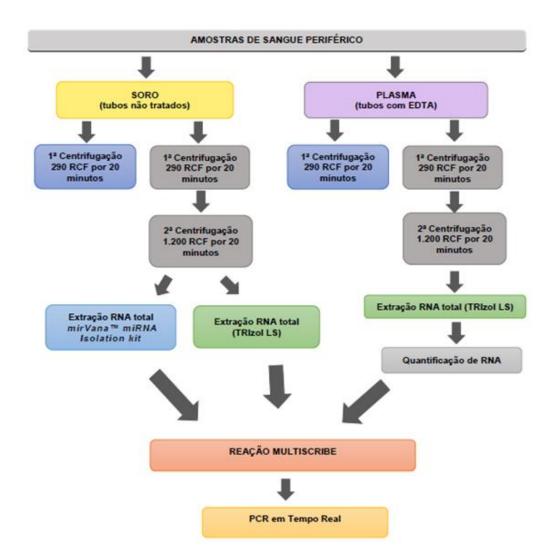
Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2017), em que: normoglicemia < 100 mg/dL, pré-diabetes: ≥ 100 e < 126 mg/dL e diabetes estabelecido ≥ 126 mg/dL;

- Insulina: determinada pelo método de quimioluminescência, valores expressos em μU/ml, em que os valores de referência para insulinemia ideal estão entre: 1,90 a 23 mcUl/mL;
- Índice de resistência à insulina: determinado pela aplicação da fórmula do HOMA-IR (homeostasis model assessment- insulin resistance), em que a resistência é determinada pelo produto da insulinemia (μU/mL) e pela glicemia de jejum (mg/dL), dividido por 22,5. A RI é determinada pelo HOMA-IR ≥ 2,71, de acordo com o observado na amostra da população brasileira de origem multiétnica (GELONEZE, 2006.)
- Perfil lipídico: composto por colesterol total (CT), HDL-colesterol (HDL-C) e triglicerídeos (TG), determinados pelo método enzimático colorimétrico. O LDL colesterol (LDL-C) foi estimado pela fórmula de Friedwald. Os valores de referência adotados foram baseados nas Novas Metas de Colesterol da Diretriz de Dislipidemia da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC, 2017) para adultos com idade > 20 anos, onde os valores de referência são: CT < 190 mg/dL, HDL > 40 mg/dL, triglicerídeos < 150 mg/dL. Os valores do LDL-L colesterol variam de acordo com a risco cardiovascular estimado, em que: < 130 mg/dL baixo risco, < 100 mg/dL risco intermediário, < 70 mg/dL risco alto, < 50 mg/dL risco.</p>

# 4.6 Padronização do protocolo de extração de miRNAs circulantes

Uma das etapas deste trabalho consistiu na padronização de extração de miRNAs circulantes para a determinação do fluido biológico e o número de centrifugações a serem utilizados (Figura 8).

Figura 8- Fluxograma da padronização do protocolo de extração de miRNAs circulantes. Amostras de sangue períferico separadas em soro e plasma, submetidas a etapas de centrifugações e avaliação molecular após extração de miRNAs circulantes.



Para esta etapa foram utilizadas quatro amostras, coletadas em tubos com EDTA e sem EDTA, plasma e soro respectivamente e divididas em dois grupos: soro e plasma submetidos a uma centrifugação com 290 RCF 20° C (relative centrifugal force) por 20 minutos a 20° C; soro e plasma submetidos a duas centrifugações, sendo a segunda centrifugação com 1200 RCF a 20 minutos, para a remoção de contaminantes celulares. A etapa seguinte foi comum a todos os grupos, sendo realizada a extração de RNA total com protocolo com TRizol LS e após esta etapa, realizou-se a quantificação, síntese de cDNA e Qpcr.

Posteriormente, um protocolo com soro foi testado, utilizando o *miRNA* Isolation kit (Invitrogen™ - cat #AM1560). Após a extração de RNA total,

confecciounou-se a fita de DNA complementar (cDNA) e PCR em tempo real (qPCR). Os protocolos de isolamento de miRNA no soro, síntese de cDNA e qPCR serão descritos a seguir.

### 4.7 Coleta de sangue periférico para análises moleculares

A coleta de sangue periférico para a obtenção de soro dos voluntários foi realizada em tubos não tratados com EDTA. Um volume de aproximadamente 5mL foi coletado para a extração de RNA. Antes da realização da separação do sangue, deixamos a amostra em temperatura ambiente por 30 minutos para permitir a coagulação espontânea. Após a formação do coágulo, a amostra foi submetida a uma primeira centrifugação de 290 RCF por 20 minutos a 20°C. A fase do soro foi coletada e transferida para tubos de 15 mL. Esta fase foi submetida a uma segunda centrifugação de 1200 RCF por 20 minutos a 20° C, para a precipitação de quaisquer células residuais. Posteriormente à esta segunda centrifugação, o sobrenadante foi transferido para tubos de 2,0 mL e estocados no -80°C.

## 4.8 Extração de RNA das amostras

Para a extração de RNA das amostras de soro, foi utilizado o *mirVana™ miRNA Isolation kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, cat #AM1560), com algumas modificações no protocolo descrito a seguir resumidamente: para os 500μL do soro obtido através das duas etapas de centrifugação e posteriormente estocado, foi adicionado o mesmo volume de 2X *Denaturing Solution*, em seguida, misturado e incubado no gelo por 5 minutos, o mesmo volume de fenol-clorofórmio foi adicionado, totalizando um volume de 1000 μL. Essa solução foi homogeneizada e submetida a uma centrifugação de 12 000 RCF por 10 minutos em temperatura ambiente. Esta etapa de centrifugação foi realizada para a obtenção da fase aquosa contendo ácidos nucléicos, e repetida com a adição de água *endonuclease free* a fase orgânica fenol-clorofórmio, até a obtenção de um volume total de 1100 μL de fase aquosa. Após a separação desta fase, seguiu-se as recomendações do

′

fabricante para a purificação e isolamento de pequenos RNAs. Após este processo, 50 μL de água *endonuclease free,* aquecida à 95°C, foi aplicada diretamente no centro do filtro. Por último, uma nova centrifugação foi realizada e o filtrado, contendo os pequenos RNAs, foi estocado a -80° C.

## 4.9 Confecção dos cDNAs

A escolha dos miRNAs foi baseada na literatura e em bancos de dados de miRNAs (www.mirbase.org e www.diana.imis.athena-innovation.gr). A confecção dos cDNAs de cada miRNA analisado (miR-17-5p, miR-103-3p e miR-375-3p) e dos endógenos (miR-16, Let 7i) foi realizada com o *kit MicroRNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific) *e primers* Taqman para cada miRNA analisado. Foram necessários 0,15 µL de dNTPs, 1 µL de *Multiscribe™ RT enzyme* (50 U/ µL), 1,5 µL de *Buffer* 10 X, 0,19 µL de *RNAse inhibitor* (20 U/µL), 4,16 µL de H₂O *RNAse free*, 3 µL de *prime*r (miR-375-3p ID000564, miR-17-5p ID002308, miR-103-3p ID000439, miR-16 ID000391 , Let-7i ID002233). As condições para a amplificação foram: 16 °C por 30 min, 42 °C por 30 min e 85 °C por 5 min

#### 4.10 Análise dos miRNAs por PCR quantitativa (qPCR)

A técnica de qPCR consiste na coleta de dados à medida que a reação ocorre, de modo que a amplificação e detecção ocorrem concomitantemente, diferindo-a da PCR convencional em que é necessário um número prédeterminado de ciclos para que a detecção ocorra. O resultado desta técnica é representado na forma de gráfico de amplificações, formado durante a reação. O produto acumulado na fase logarítmica da reação de amplificação está diretamente relacionado à quantidade de molde existente no início da reação, e os valores utilizados na quantificação são obtidos através da determinação do threshold que representa o ponto em que a reação atinge a maior intensidade de fluorescência. O Cycle threshold (Ct) é o ciclo da PCR em que o nível de fluorescência ultrapassa o threshold. Este parâmetro é utilizado para calcular a quantidade de produto no início da reação.

Para a avaliação da expressão dos miRNAs, utilizou-se o sistema de Taqman (Thermo Fisher Scientific) que consiste na utilização de dois primers e uma sonda específicos para o transcrito em análise. Foram utilizados os primers para todos os miRNAs do estudo e seus normalizadores. As reações foram todas realizadas em triplicata, sempre com a presença de um controle negativo de reação, num volume total 20 μL para cada reação e o método da expressão relativa 2-ΔΔCt. As reações consistiram na aplicação de 1,33 μL de produto de cDNA, 10 μL 2 TaqMan® Universal PCR Master Mix II (2×), no UNG (Applied Biosystems) e 1 μL de *TaqMan*® *Small RNA Assay* e 7,67 μL de H<sub>2</sub>O nuclease *free.* As reações foram realizadas no aparelho *QuantStudio 7 (Applied Biosystems,* Foster City, Califórnia, EUA) e as condições para a amplificação foram: Hold de 50 °C por 2 min, Hold de 95 °C por 10 min seguidos de 40 ciclos de denaturação 95 °C por 15s e anelamento e extensão 60 °C por 1min. O valor de corte para considerar a diferença de expressão foi de duas vezes

#### 4.11 Análises de dados

Os dados clínicos e demográficos obtidos foram analisados pelo pacote estatístico IBM-SPSS (versão 19, IBM Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Foram calculadas a média de idade, frequência do gênero. Para as análises, os participantes foram classificados de acordo com o IMC e com as alterações apresentadas. Foram considerados saudáveis os indíviduos que não apresentaram alterações em quaisquer uma das variáveis estudadas e não saudáveis aqueles que apresentaram pelo menos uma alteração destas. Os indíviduos com SM, RI, CC e níveis pressóricos elevados, perfis de miRNAs alterados foram analisados separadamente.

As diferenças significativas nos parâmetros clínicos e sociodemográficos entre os grupos foram avaliadas pelos testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Relações entre os parâmetros clínicos e moleculares foram realizadas utilizando o Coeficiente de Correlação de Spearman. Foram consideradas significativos os valores de p< 0,05.

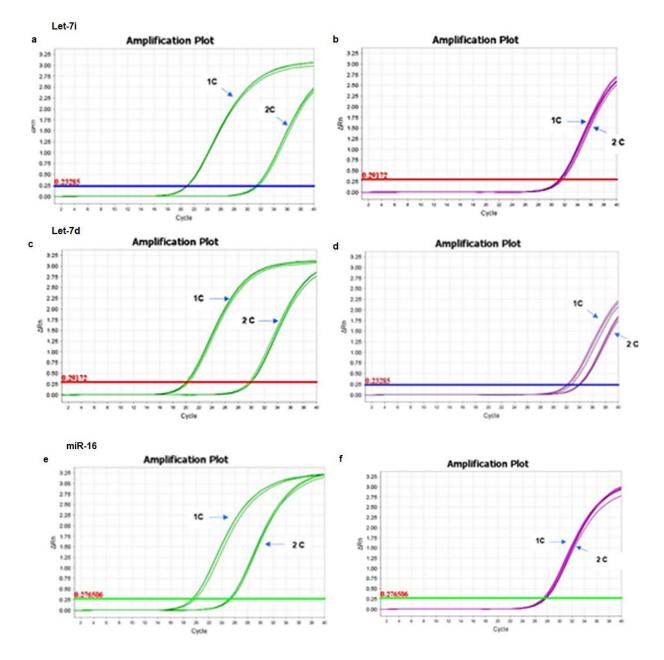
#### 5 Resultados

# 5.1 Padronização do protocolo de extração de miRNAs circulantes

A etapa inicial deste estudo foi dedicada à padronização do protocolo de extração de miRNAs circulantes em amostra de sangue, pois há uma divergência na literatura a respeito de qual protocolo seria o mais adequado para a extração destas moleculas. Em um primeiro momento, tomamos como base os protocolos descritos por Zaporozhchenko *et al.* (2015) e Lekchnov *et al.* (2016) que utilizaram amostras de plasma com diferentes centrifugações. Comparamos estas amostras com amostras de soro. Procuramos avaliar também nesta etapa, o melhor normalizador para a reação de qPCR.

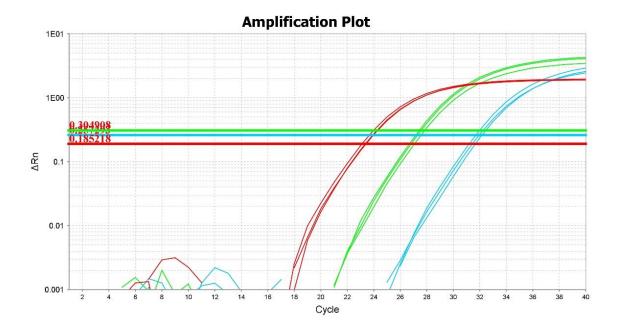
Verificamos que as amostras de plasma, submetidas à apenas uma centrifugação, os endógenos miR-16, let-7i e let-7d apresentaram melhores amplificações, ou seja, amplificações em ciclos mais precoces (Figuras 9a, 9c e 9e) em comparação ao soro (Figura 9b, 9d e 9f). Porém, uma análise posterior em Câmara de *Neubauer* demonstrou que, o plasma com uma e até mesmo com duas centrifugações, apresentava quantidades representativas de componentes celulares. O que nos levou a cogitar que a amplificação observada dos endógenos poderia ser proveniente na verdade de plaquetas, ou seja, de miRNAs celulares, e não de miRNAs circulantes. Em relação aos endógenos selecionados para análise, miR-16, apresentou-se mais estável e com menos variação de Cts entre as amostras analisadas (Figura 9e e 9f) sendo selecionado como controle endógeno para as análises seguintes.

Figura 9. Avaliação do número de centrifugações e controles endógenos em plasma e soro. (a) Let-7d no plasma com uma e duas centrifugações; (b) Let-7d no soro com uma e duas centrifugações; (c) Let-7i no plasma com uma e duas centrifugações; (d) Let-7i no soro com uma e duas centrifugações; (e) miR-16 no plasma com uma ou duas centrifugações; (f) miR-16 no soro com uma ou duas centrifugações. Observamos que as amostras de plasma com uma centrifugação apresentaram amplificações em ciclos mais precoces para os controles endógenos quando comparados ao plasma com duas centrifugações. O soro apresentou amplificações em ciclos mais tardios para os controles endógeno independente do número de centrifugações.



Com base nos protocolos propostos por Burgos e Van Keuren-Jensen (2014) e Farina e colaboradores (2013), que utilizaram *kit*s comerciais para o isolamento de miRNAs circulantes, o protocolo do plasma foi abandonado e o soro foi adotado como material biológico utilizou-se um *kit* de extração para as análises dos miRNAs circulantes (**Figura 10**).

**Figura 10.** Avaliação dos controles endógenos no soro. Nota-se que o miR-16 e Let-7i apresentaram amplificações em CTs mais precoces em amostras de soro com duas centrifugações e utilizando o kit para isolamento de miRNAs circulantes. As amplificações dos endógenos podem ser identificadas através das cores, em que o vermelho representa o miR-16, verde – Let-7i e azul – Let-7d.



# 5.2. Caracterização da população do estudo

A amostra total foi composta por 46 indivíduos. Entretanto, somente de 32 pacientes preenchiam os requisitos dos critérios de inclusão necessários para as análises moleculares.

Após o exame físico e a obtenção das medidas antropométricas, os participantes foram classificados e divididos em três grupos de acordo com o cálculo do IMC. Os grupos foram dispostos da seguinte maneira: eutróficos (n=12), sobrepesos (n=10) e obesos (n=10) (Tabela 1).

Em relação ao gênero, a amostra apresentou um predomínio de indivíduos do sexo feminino (71,87%). As idades mínima e máxima foram de 20

1

e 43 anos, respectivamente. Quanto à raça/etnia, houve predominância das raças branca (37, 5%) e parda (34, 3%).

Dentre as variáveis antropométricas, 25% da amostra total apresentaram medidas acima do ponto de corte para CC; a maioria desses indivíduos estava no grupo obeso (n=6), porém também encontramos indivíduos do grupo sobrepeso (n=1) e eutrófico (n=1). Em relação à RQC, observamos que em 12,5% da amostra total, em que se inserem três obesos e um eutrófico, apresentaram medidas mais elevadas para esta variável.

Observamos que P.A. tanto sistólica (p= 0,011) como diastólica (0,003) estava significativamentete elevada no grupo sobrepeso em relação ao grupo obeso (118,76 mmHg e 77,89 mmHg, respectivamente) e consequentemente, uma pressão arterial média também mais elevada (95,29 mmHg). Neste mesmo grupo (sobrepeso), verificamos ainda um perfil lipídico mais elevado: triglicerídeos (115,12 mg/dL), colesterol total (190,00 mg/dL) e LDL colesterol (115,12 mg/dL). Os níveis de HDL colesterol foram mais baixos nos grupos sobrepeso (51,70 mg/dL) e obeso (50,40 mg/dL).

Os níveis glicêmicos e de insulinêmicos, mostraram-se mais elevados no grupo obeso. E em consequência disto, o índice HOMA-IR, parâmetro utilizado para verificar a resistência à insulina, também foi maior signiicativamente (HOMA-IR = 3,26) se comparado aos demais grupos.

Os dados demonstram que não houve diferenças significativas em relação ao gênero, sexo, idade, colesterol total, glicose, creatinina e uréia. No entanto, encontramos diferenças estatisticamente significativas para as demais variáveis dispostas na **Tabela 1**:

**Tabela 1.** Dados demográficos, clínicos e bioquímicos da população do estudo.

Variáveis		Eutróficos (n=12)	Sobrepeso (n =10)	Obeso (n=10)	Valor de p*
Idade		24,58 ± 5,28	29,50 ± 8,69	28,10 ± 4,72	0,152
	Feminino	91,7	70	50	
Gênero (%)	Masculino	8,3	30	50	0,033
IMC		22,57 ± 1,60	26,63 ± 1,63	$36,05 \pm 5,81$	< 0,001
Circunferência de Cintura		71,34 ± 8,77	83,75 ± 6,31	103,5 ± 20,19	< 0,001
Circunferência de Quadril		98,08 ± 4,08	104,9 ± 4,43	120,8 ± 12,92	< 0,001
Relação Cintura Quadril (RCQ)		0,70 ± 0,10	$0.79 \pm 0.04$	0,86 ± 0,13	0,007
Pressão Arte (mmHg)	erial Sistólica	105,86 ± 8,22	118,76 ± 10,82	117,05 ± 12,69	0,011
Pressão Arte Diastólica (mmHg)	erial	67,49 ± 6,33	77,89 ± 11,05	77,27 ± 5,64	0,003
Pressão Arte (mmHg	erial Média	80,25 ± 6,35	95,29 ± 11,28	90,52 ± 7,23	0,006
Colesterol to	otal (mg/dL)	178,08 ± 39,33	190,00 ± 37,80	179,30 ± 21,89	0,808
HDL coleste	rol (mg/dL)	63,33 ± 14,66	51,70 ± 9,12	50,40 ± 9,77	0,035
LDL colesterol (mg/dL)		99,10 ± 30,80	115,12 ± 35,78	111,78 ± 23,38	0,052
Triglicerídeo	s (mg/dL)	$78,08 \pm 28,73$	115,90 ± 42,68	109,90 ± 73,20	0,048
Glicose (mg/	/dL)	88,41 ± 8,41	87,10 ± 5,30	95,10 ± 12,53	0,217
Insulina (mc	U/mL)	6,19 ± 3,13	10,44 ± 4,92	14,13 ± 9,81	0,015
HOMA-IR		1,37 ± 0,76	2,21 ± 1,02	3,26 ± 2,29	0,011
Creatinina		0,90 ± 0,11	$0,98 \pm 0,18$	1,02 ± 0,12	0,101
Uréia		26,33 ± 23,19	22,10 ± 7,07	27,40 ± 8,82	0,210

5.3. Avaliação da expressão de miR-17-5p, miR-103-3p e miR-375-3p nos diferentes grupos do estudo

Para a obtenção do nível de expressão dos miRNAs foi utilizado o cálculo da expressão relativa de acordo com o método do  $2^{-\Delta\Delta}$ Ct (Livak and Schmittgen 2001). O método do  $2^{-\Delta\Delta}$ Ct, ou método comparativo de Ct, trata-se de uma equação matemática em que as mudanças na expressão gênica são calculadas através das diferenças entre as amostras calibradoras (grupo de indíviduos eutróficos) e as experimentais (sobrepeso e obeso), normalizadas por uma referência. Vale ressaltar que o valor atribuído à  $\Delta$ Ct equivale à diferença entre o valor da média dos Cts do gene de interesse e a média dos Cts do gene normalizador. O cálculo da fórmula  $\Delta\Delta$ Ct envolve a subtração entre o valor de  $\Delta$ Ct para cada amostra experimental e o valor de  $\Delta$ Ct para as amostras calibradoras. Foi estabelecido um ponto de corte de 2 para considerar a variação de expressão destes miRNAs. Deste modo, os miRNAs com *fold change* (quantificação relativa) com valores acima de 2,0 foram considerados hiperexpressos e abaixo de 0,5 foram considerados hipoexpressos segundo a equação do  $2^{-\Delta\Delta$ Ct} (**Tabela 2**).

Não foi observada variação de expressão de miR-17-5p na maioria (87,5%) das amostras analisadas. A variação de expressão deste miRNA no restante das amostras (12,5%) foi caracterizada pela hiperexpressão em apenas um indivíduo (SP10) e pela redução na expressão em três pacientes (OB3, OB5 e OB7). miR-103-3p apresentou uma tendência à hipoexpressão entre os grupos, sendo mais significativa no grupo obeso (50% dos indivíduos). As análises de miR-375-3p demonstraram que este miRNA encontrou-se diferencialmente expresso em todos os grupos. O aumento de expressão de miR-375-3p foi observado em seis indivíduos (EU5, EU12, SP9, SP10, OB4 e OB7) e a hipoexpressão foi notada em oito indivíduos (EU 1, EU13, SP4, SP5 e SP8, OB3, OB5 e OB6) (Tabela 2).

**Tabela 2-** Expressão dos miRNAs circulantes no grupo de eutróficos, sobrepeso e obesos.

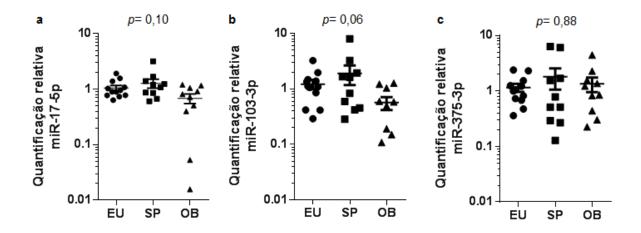
A	miR-17-5p	miR-103-3p	miR-375-3p
Amostra	FC*	FC	FC
EU1	0,635	0,417	0,359
EU4	0,780	0,291	0,682
EU5	0,775	0,415	2,314
EU6	1,389	1,474	1,245
EU9	1,034	1,384	1,219
EU10	1,080	1,346	0,995
EU11	0,957	1,065	0,728
EU12	1,918	1,964	2,397
EU13	0,897	1,095	0,473
EU14	0,733	0,852	0,818
EU15	1,573	3,240	1,056
EU16	0,893	1,121	1,538
SP1	0,672	0,456	0,513
SP2	1,241	1,612	1,546
SP3	0,868	0,594	0,510
SP4	0,856	0,832	0,268
SP5	1,397	0,421	0,292
SP6	1,081	1,658	0,780
SP7	1,675	3,261	1,690
SP8	0,608	0,285	0,128
SP9	1,197	1,934	6,342
SP10	3,190	7,989	6,081
OB1	0,914	0,108	0,850
OB2	0,815	0,495	1,368
OB3	0,401	0,149	0,303
OB4	0,721	0,192	2,281
OB5	0,053	0,009	0,225
OB6	0,015	0,583	0,441
OB7	1,057	1,221	4,447
OB8	1,203	1,272	1,559
OB9	1,166	1,036	1,223
OB10	0,511	0,597	0,824

 $<sup>^*</sup>$  FC - valores de Fold-change obtidos pelo método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  nas análises entre os grupos sobrepeso (SP) e obeso (OB) em comparação ao grupo de eutróficos (EU). Os valores em vermelho representam os valores que estão hiperexpressos; valores na cor azul representam a hipoexpressão dos miRNAs em cada amostra.

# 5.4. Relação da expressão miR-17-5p, miR-103-3p e miR-375-3p e os grupos analisados

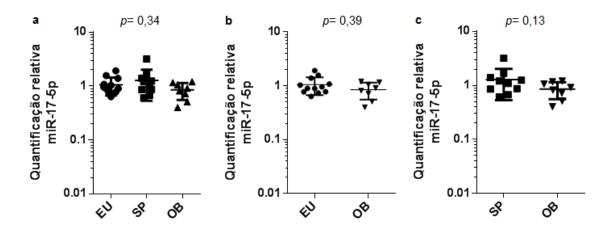
As análises de expressão dos miRNAs entre os três grupos estudados demonstraram que miR-17-5p e miR-375 não diferiram significativamente entre os grupos analisados (p= 0,10 e p= 0,80 respectivamente) (Figuras 11a e 11c). Houve uma pequena tendência para diferença de expressão para miR-103-3p (p= 0,06) (Figura 11b).

Figura 11 - Análise de expressão de miR-17-5p, miR-103-3p e miR-375-3p por qPCR nos grupos eutrófico, sobrepeso e obeso.(a) Perfis de expressão de miR-17-5p (a), miR-103-3p (b), miR-375 (c); Valores de *fold- change* expressos em escala  $\log 10$ , p < 0.05.



Entretanto, como pode-se observar no gráfico acima, dois pacientes do grupo obeso apresentaram uma expressão bastante reduzida para miR-17-5p (OB5 e OB6) (Figura 11a). No intuito de determinar se estas amostras estariam interferindo nas análises, realizou-se um novo cálculo excluindo estes dois pacientes. Porém, não foi constatada nenhuma diferença de expressão para este quando analisamos todos os grupos (p= 0,34) (Figura 12a), nem quando comparamos separadamente pacientes eutróficos vs obesos (p= 0,39) (Figura 12 b) ou sobrepeso vs obesos (p= 0,13) (Figura 12c).

Figura 12- Análise de expressão dos miR-17-5p por qPCR sem os outliers. Perfis de expressão de miR-17-5p entre os grupos eutrófico, sobrepeso e obeso (a), grupo eutrófico comparado ao grupo obeso (b), grupo sobrepeso comparado ao obeso (c). Valores de foldchange expressos em escala  $\log 10$ , p < 0.05.

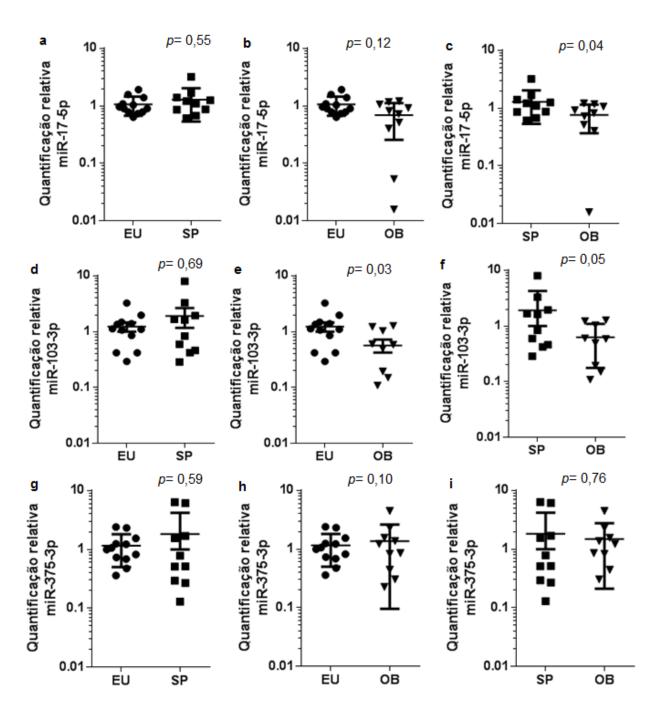


Nas análises comparativas considerando somente dois grupos, encontramos uma redução significativa na expressão de miR-17-5p no grupo obeso comparado ao grupo sobrepeso (p= 0,04) (Figura 13c). Não foi encontrada diferença de expressão para miR-17-5p nas demais comparações realizadas (Figuras 13a e 13b).

O miR-103-3p se apresentou significativamente diminuído (p= 0,03) no grupo obeso comparado ao grupo eutrófico (**Figura 13e**) e uma tendência à hipoexpressão (p=0,05) foi enconrada quando comparamos o grupo de obesos com o grupo sobrepeso (**Figura 13f**). Não foi encontrada diferença significativa para miR-103-3p quando comparamos o grupo eutrófico com o grupo sobrepeso.

Em relação a miR-375-3p, não houve diferença de expressão significativa em nenhuma comparação realizada entre os grupos: eutrófico vs obeso (p= 0,10) (Figura 13g), eutrófico vs sobrepeso (p=0,59) (Figura 13h) e obeso vs sobrepeso (p= 0,76) (Figura 13i).

Figura 13- Expressão dos miRNAs por qPCR em todas as amostras. Perfis de expressão de miR-17-5p em eutróficos Vs sobrepeso (a), eutróficos Vs obeso (b), sobrepeso Vs obeso (c). Perfis de expressão miR-103-3p em eutróficos Vs sobrepeso (d), eutróficos Vs obeso (e), sobrepeso Vs obeso (f). Perfis de expressão de e miR-375-3p eutróficos Vs sobrepeso (g), sobrepeso Vs obeso (h), sobrepeso Vs obeso (i). Valores de fold-change expressos em escala log10, p < 0.05.



5.5. Correlação entre a expressão de miR-17-5p, miR-103-3p e miR-375-3p com as variáveis demográficas, antropométricas e bioquímicas dos pacientes analisados.

Nas análises de correlação, miR-17-5p e miR-375-3p não apresentaram correlação com os dados demográficos, antropométricos e bioquímicos dos pacientes avaliadas neste estudo. No entanto, foi encontrada uma correlação inversa entre miR-103-3p e a circunferência de cintura (r= - 0,354, p= 0,040). Quando correlacionamos a expressão dos miRNAs entre si verificamos que estas moléculas apresentam uma correlação positiva entre miR-103-3p vs miR-375-3p (r= 0,582; p < 0,001); miR-103-3p vs miR-17-5p (r= 0,801; p < 0,001) e miR-17-5p vs miR-375-3p (r= 0,576, p= 0,001).

#### 6 Discussão

Nas últimas décadas, a obesidade e as doenças metabólicas associadas, como: DM2, HA e síndrome metabólica, assumiram proporções epidêmicas em todo o mundo, gerando impactos econômicos com altos custos em saúde pública. Isto ressalta a necessidade da implementação de políticas educativas, demandando uma maior atenção não só da clínica, como também da ciência básica (CAI *et al.*, 2013).

Este estudo teve por objetivo avaliação de miRNAs circulantes anteriormente relacionados com obesidade, DM, inflamação, SM e hipercolesterolemia (KAROLINA et al., 2012; SAKAGUCHI et al., 2006; SEYHAN et al., 2016) no soro de pacientes eutróficos e com excesso de peso, e correlacionar a expressão destas moléculas com dados demográficos, clínicos, antropométricos e bioquímicos destes pacientes. A população do presente estudo foi composta por 32 indivíduos, brancos e do sexo feminino em sua maioria. A faixa etária variou de 20 a 43 anos de idade. Estes indivíduos foram divididos em três grupos distintos através do IMC (eutróficos, sobrepeso e obesos).

O grupo sobrepeso apresentou uma maior média de idade (29,50 ± 8,69), seguido de pacientes obesos e eutróficos. A média de IMC do grupo obeso foi de 36,05 (± 5,81). Em adultos, o critério mais utilizado para classificar o estudo nutricional dos indivíduos é o IMC, que compreende desde o baixo peso aos graus de obesidade (WHO, 2017), porém como já mencionado, esta medida não reflete a distribuição real de gordura corporal, necessitando de outras medidas antropométricas (SUN et al, 2010). Estudos epidemiológicos demonstraram a correlação entre excesso de peso e risco para doenças cardiometabólicas em adultos (DA COSTA et al., 2012; VANAVANAN et al., 2018).

Dados divulgados pelo Ministério da Saúde revelaram que mais da metade (56,9%) da população brasileira com idade igual ou superior a 18 anos, está com excesso de peso. Isto foi constatado através da realização das medidas antropométricas com pesagem e mensuração de c pelo programa da Pesquisa Nacional de Saúde (Ministério da Saúde, 2015), parâmetros que também foram utilizados em nossa pesquisa. Estudos longitudinais em relação às variações do IMC indicaram que o maior ganho de peso corporal acontece nas faixas etárias

mais jovens (CAMAN et al., 2013; PAJUNEN et al., 2012; JACOBSEN et al., 2015).

Em relação aos valores de CC, CQ e RCQ foram encontradas em nosso estudo diferenças significativas entre os grupos analisados com maiores valores sendo registrados no grupo obeso, seguido respectivamente do grupo sobrepeso e eutrófico. A maioria dos indivíduos deste estudo (62,5% da amostra) estava fora do ponto de corte para CC e RCQ que indicam risco de doença cardiometabólica e vascular. Dentre os indivíduos dos grupos eutrófico, obeso e sobrepeso (25% da amostra), apresentaram valores de CC acima do ponto de corte, enquanto que para RCQ (21,8% da amostra), também elevados. Essas medidas são consideradas bons preditivos para risco de DCV, que de acordo com o estabelecido pela WHO, para a população brasileira, o ponto de corte é uma medida igual ou superior a 94 cm para homens e 80 cm para mulheres (WHO, 2008). Uma correlação positiva entre CC e IMC já foi descrita, além dos dados também terem evidenciado que a CC é um fator para DCV, independente do estado nutricional (MENKE et al., 2007; ZHU et al., 2002).

A CC ganhou destaque por ser considerado um bom marcador de obesidade visceral, e tem sido muito utilizada não só na prática clínica como também em "pesquisas". A CC, juntamente com CQ e RCQ possuem uma forte associação com risco cardiometabólico, pois a obesidade central está intimamente associada as disfunções do tecido adiposo, além de fazer parte dos requisitos para o diagnóstico de SM (KLEIN et al.,2007; CARR E BRUNZELL, 2004; ASHWELL E GIBSON, 2016).No grupo dos eutróficos, encontramos um indivíduo (SP16) com uma medida para CC e RCQ, acima do ponto de corte já estabelecido pela WHO (2008), corroborando com estudos prévios que demonstraram que indivíduos com IMC que compreende a faixa de peso normal, podem apresentar um perímetro para CC mais elevado (BOOTH et al., 2000; ARDEN et al., 2004).

Em relação a RCQ, onde o ponto de corte utilizado como preditivo para risco de doença cardiometabólica e também como referência para o diagnóstico de Síndrome Metabólica, estabelecido pela WHO (2008): maior ou igual que 90 cm e 85 cm em homens e mulheres, respectivamente; em três pacientes obesos (30% do grupo obeso), foram encontrados valores que sinalizam que estes podem ser candidatos em risco potencial para tais desordens metabólicas. Por

tratar-se de uma medida que abrange a mensuração do quadril, sendo inversamente relacionada aos níveis alterados de glicemia e perfil lipídico, HA, DM e DCV, mostrando-se ser um indicador superior para DCV e mortalidade, quando comparado a outras medidas antropométricas (OKURA *et al.*, 2004; HEITMANN *et al.*, 2004).

A CC também foi proposta como preditivo de anormalidades do perfil lipídico. Brenner e colaboradores (2010), verificaram que em uma população composta por homem interessados em investigar um melhor preditivo para os níveis séricos de lipídios em uma amostra composta por homens e mulheres de etnias caucasiana e asiática, verificaram que a CC seria o melhor marcador de concentrações lipídicas, quando comparado ao IMC. Em nossa população de estudo, observamos que 25% da amostra, onde está inserido um indivíduo eutrófico (EU16), apresentou um maior perímetro abdominal e exibiram níveis de pelo menos uma das variáveis do perfil lipídico fora dos valores de referência para normalidade estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Cardiologia- SBC (2017), onde: CT <190 mg/dL, HDL-c >40 mg/dL, LDL-c <130 mg/dL e TG < 150 mg/dL.

Em relação ao perfil lipídico, em nossa casuística todos os grupos exibiram níveis elevados para pelo menos uma das variáveis lipídicas. Para o colesterol total, observamos que o grupo eutrófico apresentou um maior percentual (41,6%) quando comparado ao demais grupos sobrepeso (20%) e obeso (20%). Estudos conduzidos no Brasil por Carvalho e colaboradores (2007) e De Souza e colaboradores (2003) associaram a dislipidemia, entidade clínica caracterizada pela ocorrência de pelo menos uma alteração do perfil lipídico, como como o aumento nos níveis de TG e LDL-c e redução de HDL-c (SBC, 2017), ao sobrepeso e obesidade.

Embora níveis elevados de triglicerídeos sejam esperados em obesos e sobrepeso, 90% dos obesos e 80% dos sobrepesos, estavam dentro dos parâmetros de normalidade para TG fixados pela SBC (2017). A associação entre medidas antropométricas e metabolismo de glicose já foram bem discutidos. Em relação ao perfil glicêmico e de insulinemia, 70% da amostra estava dentro dos valores de referência estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Diabetes (2017), em contrapartida estudos prévios (SAARISTO et al., 2008; GÓMEZ-AMBROSI et al., 2011 e BOMBELLI et al., 2011) correlacionaram tanto

sobrepeso quanto a obesidade com distúrbios do metabolismo de glicose. Embora os valores de glicose e insulina estivessem dentro da normalidade, valores para o *Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance* (HOMA-IR), estavam acima do ponto de corte para a população brasileira (> 2,71), em todos os grupos: eutrófico (8,3%), sobrepeso (20%), obesos (40%).

O HOMA-IR trata-se de uma das principais ferramentas para a detecção de resistência à insulina, com base nos níveis de glicemia e insulinemia de jejum. A RI desempenha um papel essencial para o desenvolvimento de fatores de risco para doenças cardiometabólicas (XIA et al., 2012). O papel da obesidade, seja esta mensurada pelo IMC ou percentual de gordura corporal, foi fortemente correlacionada a RI, como descrito recentemente por Lim e colaboradores (2015), corroborando com estudos prévios de Gomez-Ambrosi e colaboradores (2011), que também sugeriram que a gordura corporal exerce uma função crucial no desenvolvimento de RI. Além de DM2, e dislipidemia, a RI também foi associada a hipertensão arterial (LAMOUNIER-ZEPTER et al., 2006; REAVEN, 2003).

Nas análises dos níveis pressóricos, 93,7% da amostra estava dentro dos níveis para indivíduos normotensos de acordo com a SBC (2017). Apenas dois pacientes, um obeso e um sobrepeso (OB2 e SP2), apresentaram níveis mais elevados para esta variável. O sobrepeso e obesidade juntamente com o aumento de gordura visceral, estão entre os principais fatores para a ocorrência de hipertensão arterial (Hall *et al.*, 2015). No grupo obeso, observamos que um paciente, que além de apresentar níveis de mais elevados de PAS e PAD, também apresentou CC acima da ponte de corte.

Nossos resultados indicam que dois de nossos pacientes (SP7 e OB2), um obeso e um sobrepeso, respectivamente, preenchem pelo menos três dos cinco critérios para Síndrome Metabólica, onde se inserem fatores de risco complexos para DCV e DM, níveis de pressão arterial elevados, adiposidade central, baixos níveis de HDL-C, aumento de TG e distúrbios glicêmicos (ALBERTI et al., 2009).

Diante dos nossos achados e de os miRNAs terem sido apontados como potenciais biomarcadores de identificação precoce de diversas condições patológicas, incluindo obesidade e desordens metabólicas associadas (BARTEL 2004; MALOYAN *et al.*, 2013), há um grande interesse da área biomoédica pelos

miRNAs circulantes, uma vez que o acompanhamento destas moléculas permitiriam avaliar a propensão e o risco de desenvolvimento de doenças, avaliação da evolução da doença e concomitantemente fornecer a confirmação de diagnósticos pré-clínicos (GOGUET-RUBIO *et al.*, 2017). Convém mencionar também que a obtenção destas moléculas no soro se constitui uma abordagem mais rápida, de menor custo, menos invasiva e com menor risco de morbidade.

Há muitos desafios em relação a análise de miRNAs em amostra de soro e plasma, devido à dificuldade no que diz respeito ao isolamento de miRNAs nestes fluidos e a geração de volumes substanciais de fase aquosa, além da necessidade de garantir que as proteínas que estão em teor elevado sejam removidas. A presença da uma elevada concentração de enzimas, também se configura um problema, pois estas podem interferir na síntese de cDNA e a qPCR (MOLDOVAN et al., 2014; Costa et al., 2014). Diversos protocolos foram revisados e propostos, porém como já mencionado não há um protocolo bem estabelecido na literatura.

Há diversas considerações a serem feitas no protocolo de extração de miRNAs circulantes, incluindo a coleta e preparação adequada do sangue periférico, além das variáveis pré-analíticas e analíticas para a extração destas moléculas, como por exemplo: tipo de fluido, número de centrifugações, método de extração de RNA (KROH et al., 2010). Na etapa de padronização de protocolo no primeiro momento, nossos resultados haviam apontado para o plasma como material adequado para as nossas análises, em virtude das amplificações em Cts mais precoces dos possíveis controles endógenos. Entretanto, devido à possibilidade de contaminação por plaquetas que já reportada no plasma, em que houve uma liberação de miRNAs circulantes por plaquetas, podendo não corresponder à assinatura da doença, tão pouco o estado real da doença (MITCHELL et al., 2016) resolvemos abandoná-lo. Foi realizada uma análise do plasma coletado após duas centrifugações do sangue em Câmara de Neubauer, em que verificamos a existência de uma população representativa de partículas sugestivas de plaquetas. Diante disso, optamos pelo soro como material biológico para a realização das análises de miRNAs circulantes, vislumbrando evitar as interferências mencionadas acima, baseando-nos nos protocolos de Burgos e Van Keuren-Jensen (2014) e Farina e colaboradores (2013).

Durante a definição de um melhor protocolo para análise de miRNAs circulantes buscamos estabelecer um melhor normalizador/controle endógeno para análises de expressão relativa por qPCR. Um dos objetivos da normalização é a redução da variabilidade biológica em relação a elementos experimentais, além de padronizar e diminuir vieses na análise destas moléculas. Usualmente para miRNAs intracelulares, ou seja, em que os alvos são tecidos/células, utilizam-se como normalizadores, pequenos RNAs nucleolares como: RNU44, RNU46 e RNU48 (WANG et al., 2012; POEL et al., 2018). Contudo, para miRNAs circulantes não existem normalizadores estabelecidos e devido á variabilidade genética, também podem ocorrer variações dos níveis de expressão do controle endógeno em relação a doença a ser investigada (PRITCHARD et al., 2012).

Com base em alguns estudos, utilizamos como candidatos a controles endógenos Let-7i, Let-7 d e miR-16 (XIANG et al., 2014; ZHANG et al., 2016; QI et al., 2012). Inicialmente, os endógenos miR-16 e Let-7i foram os normalizadores escolhidos. Porém no decorrer das nossas análises, verificamos que o Let-7i apresentou grande variabilidade entre as amostras, ao contrário do miR-16, que mostrou uma expressão constante, corroborando com os estudos de Resnick et al. (2009) e Huang et al. (2010) e com os estudos que sugerem que este miRNA é um controle endógeno adequado quando se trata de normalização de miRNAs circulantes (WANG e ZHANG, 2012; LIU et al., 2013; LI et al., 2013).

Na análise dos níveis de expressão do miR-17-5p não foram observadas diferenças de expressão significativas entre os três grupos. Em 20% do grupo obeso, este miRNA apresentou níveis mais reduzidos, corroborando com os achados de Hsieh e colaboradores (2015), que reportaram uma hipoexpressão do *cluster* ao qual este miRNA pertence, no soro de animais com obesidade induzida por dieta. Além disto, quando fazemos comparações entre grupos, observamos que no grupo obeso este miRNA encontrava-se significativamente reduzido quando comparado aos indivíduos com sobrepeso (p= 0,04), podendo sugerir que o grau de adiposidade esteja relacionado a redução dos níveis deste miRNA circulante; em células, Li e colaboradores (2013) evidenciaram que os níveis de expressão deste miRNA encontram-se elevados durante a diferenciação adipogênica.

Como mencionado anteriormente, encontramos um paciente do grupo sobrepeso com níveis muito elevados para este miRNA, na interpretação das variáveis antropométricas, pressóricas e bioquímicas, não foram encontrados valores fora da referência estabelecida. Além disso, dois pacientes apresentaram níveis pressóricos mais elevados, que poderiam sugerir hipertensão arterial primária. Embora este miRNA tenha sido associado à disfunção endotelial (BONAUER et al., 2009; FICHTLSCHERER et al., 2010), no soro destes pacientes não observamos diferenças de expressão deste.

Em relação a miR-375-3p embora não tenha apresentando diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ou na comparação entre dois grupos isoladamente, ele estava alterado em alguns pacientes da população analisada. miR-375-3p está relacionado com a proliferação das células β-pancreáticas, sendo altamente expresso pelo pâncreas, com atuação direta sobre a miotrofina (Mtpn), responsável por realizar a mediação da secreção de glucagon e insulina nestas células (POY et al., 2009). Não foram observadas alterações nos perfis glicêmicos dos pacientes que que apresentaram níveis mais reduzidos para este miRNA. Entretanto, apesar de não termos encontrado uma associação ou correlação para este miRNA com as variáveis analisadas neste estudo, verificamos que aqueles indivíduos que apresentaram níveis de expressão além do ponto de corte estabelecido, o HOMA-IR estava muito acima do valor de referência, sugerindo a existência de resistência à insulina.

Seyhan e colaboradores (2016), avaliaram os níveis de miRNAs no plasma de indivíduos com pré-diabetes, DM1 e DM2, demonstrando o aumento na expressão de miR-375 em indivíduos com DM1. Ainda que a amostra não seja ampla, nossos resultados corroboram com os achados de Higuchi e colaboradores (2015) que em estudo clínico transversal analisaram os perfis de expressão do deste miRNA no soro de portadores de DM2 e indivíduos com tolerância normal à glicose, e verificaram que os níveis do miR-375 estavam expressamente aumentados nos pacientes com DM2.

Os altos níveis de miR-375-3p estão implicados na redução do mecanismo de proliferação e transcrição do gene da insulina, resultando em alterações na secreção deste hormônio (LI *et al.*, 2014; EL OUAAMARI *et al.*, 2008; XIA et *al.*, 2010). Em relação ao IMC, os grupos que apresentaram perfis de expressão reduzidos para este miRNA foram os grupos sobrepeso e obeso,

isto pode inferir uma relação com a diferenciação adipogência, pois este miRNa está associado ao aumento de fatores de transcrição dos adipócitos (LING *et al.*, 2011).

miR-103-3p demonstrou uma tendência à diferença de expressão na análise comparativa entre os grupos analisados (p= 0,06). No entanto, este miRNA apresentou-se reduzido significativamente no grupo obeso quando comparado ao grupo eutrófico (p=0,03), e uma tendência à diferença de expressão no obeso comparado ao grupo sobrepeso (p=0,05). Xie e colaboradores (2009) descreveram que em obesos os perfis de expressão deste miRNA estavam mais reduzidos. Carreras-Badosa e colaboradores (2015) reportaram a hipoexpressão de miR-103 no plasma de gestantes com obesidade.

A existência de uma correlação positiva entre e miR-103, HOMA-IR e TG em pacientes portadores de DHGNA, foi relatada por Xu e colaboradores (2015), em nossa amostra verificamos que nos indivíduos (EU1, EU4, EU5,SP1, SP5, SP8, OB1, OB2, OB3, OB4 e OB5) que representa 34,3 % da amostra total, miR-103-3p exibiu perfis de expressão mais reduzidos. Em alguns destes indivíduos que miR-103-3p estava hipoexpresso, observamos valores muito elevados de HOMA-IR. No entanto, o resultado de nossas análises estatísticas não revelou a existência de uma correlação ou associação deste miRNA com HOMA-IR. Uma hiperexpressão de miR-103-3p também foi encontrada em dois indivíduos (EU15 e SP10), porém não encontramos anormalidades nas análises bioquímicas destes que pudessem ser relacionadas ao aumento da expressão deste miRNA.

Além disso, nossos resultados apontam para a existência de uma correlação negativa entre miR-103-3p e a CC (r=0,354, p= 0,04), indicando que provavelmente, este miRNA que pode se tornar um candidato a biomarcador para doenças cardiometabólicas e cardiovasculares relacionadas a obesidade. Como já mencionado, CC é um marcador antropométrico proposto como preditivo tanto alterações no perfil lipídico quanto do metabolismo de glicose (BRENNER *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2014), até o momento não está descrito na literatura a correlação entre miR-103-3p e CC.

Em nossas amostras verificamos ainda uma tendência à hipoexpressão à medida que o IMC aumenta. A correlação positiva e uma associação independente entre IMC, níveis plasmáticos de glicose e miR-103, foi encontrada

em um estudo transversal com 244 participantes gêmeos monozigóticos (BORK-JENSEN et al., 2014). Os autores sugeriram que, ainda que não fosse possível determinar uma causalidade, que o miR-103 possivelmente teria participação em distúrbios do metabolismo e no desenvolvimento de DM2 na espécie humana. Esta hipótese do envolvimento do miR-103 em distúrbios do metabolismo pode ser apoiada por estudos prévios que descrevem a influência do cluster miR-103/107 em patologias associadas a obesidade e na regulação dos genes associados ao metabolismo de lipídeos e homeostase de glicose (KAROLINA et al., 2012; TRAJKOVSKI et al., 2011; ELLIS et al., 2013).

Como já mencionado, os miRNAs possuem um alto potencial regulatório, por estarem relacionados diversas vias de sinalização. Contudo, os mecanismos epigenéticos implicados as vias de sinalização relacionadas ao metabolismo de lipídios, homeostase de glicose e fatores associados ao risco cardiometabólico, necessitam ser melhor investigados. Em suma, embora o tamanho amostral não seja amplo, nossos achados reforçam a necessidade de identificação de biomarcadores precoces para as complicações decorrentes da obesidade ainda na fase pré-clínica, pois a maioria dos participantes deste estudo eram assintomáticos. Ressaltamos ainda a necessidade de uma comparação de miRNAs circulantes com outros métodos antropométricos que analisem além do percentual de gordura, a composição corporal para uma melhor compreensão dos mecanismos que levam indivíduos que seriam considerados saudáveis, exibirem perfis bioquímicos alterados, enquanto que obesos e sobrepesos, apresentarem parâmetros de indivíduos metabolicamente saudáveis.

# 7 CONCLUSÃO

Este estudo nos permitiu concluir que:

- ✓ Soro com duas centrifugações foi o material biológico mais adequado para as análises de miRNAs circulantes;
- ✓ Corroborando com os dados da literatura o miR-16 foi o controle endógeno mais adequado para avaliação dos miRNAs circulantes no soro;
- ✓ Cerca de 30% da população geral apresentou perfil de dislipidemia, onde a maioria era composta por eutróficos;
- ✓ Cerca de 94% da população ainda não preenchiam os critérios para Síndrome Metabólica, sendo que somente 1% da população acima do peso apresentou SM, podendo ser um indicativo de um estado mais crônico de adiposopatia;
- ✓ Cerca de 20% dos indivíduos apresentaram HOMA-IR elevado, indicando um comprometimento maior do metabolismo de glicose, sendo que os obesos apresentaram o maior percentual de RI (40%);
- ✓ Uma hipoexpressão diferencial de miR-103-3p foi detectada nos indivíduos obesos e uma correlação negativa com CC, que pode ser um indicativo de um estado mais crônico e acentuado de inflamação, uma vez que ele apresenta um perfil anti-inflamatório e cardioprotetor;
- ✓ Não observamos diferença nos níveis séricos de miR-375-3p na população analisada, pois 75% da população não apresentava um quadro de RI, sendo que este miRNA é considerado um biomarcador para DM2 e disfunção pancreática;
- ✓ Observamos diferenças de expressão de miR-17-5p quando comparamos sobrepesos e obesos, podendo sugerir que o grau de adiposidade possa estar relacionado a redução dos níveis de expressão deste miRNA.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamczak M, Wiecek A. The adipose tissue as an endocrine organ. Semin Nephrol.2013 Jan;33(1):2-13

Achard V, Boullu-Ciocca S, Desbriere R, Nguyen G, Grino M. Renin receptor expression in human adipose tissue. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.2007 Jan;292(1):R274-82

Adochio R, Leitner JW, Hedlund R, Draznin B. Rescuing 3T3-L1 adipocytes from insulin resistance induced by stimulation of Akt-mammalian target of rapamycin/p70 S6 kinase (S6K1) pathway and serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: effect of reduced expression of p85alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase and S6K1 kinase. Endocrinology. 2009 Mar; 150(3):1165-73.

Ahmad N, Adam SI, Nawi AM, Hassan MR, Ghazi HF. Abdominal Obesity Indicators: Waist Circumference or Waist-to-hip Ratio in Malaysian Adults Population. Int JPrev Med. 2016 Jun 8; 7:82

Ardern CI, Janssen I, Ross R, Katzmarzyk PT. Development of health-related waist circumference thresholds within BMI categories. Obes Res. 2004 Jul; 12(7):1094-103

Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. Circulation. 2009 Oct 20;120(16):1640-5

Alvehus M, Burén J, Sjöström M, Goedecke J, Olsson T. The human visceral fat depot has a unique inflammatory profile. Obesity (Silver Spring). 2010 May;18(5):879-83

Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G,Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T. A uniform system for microRNA annotation. RNA. 2003 Mar;9(3):277-9.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2015 Jan;38 Suppl:S8-S16

Anderson AS, Key TJ, Norat T, Scoccianti C, Cecchini M, Berrino F, Boutron Ruault MC, Espina C, Leitzmann M, Powers H, Wiseman M, Romieu I. European Code against Cancer 4th Edition: Obesity, body fatness and cancer. Cancer Epidemiol. 2015 Dec;39 Suppl 1:S34-45.

Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Mar 22;108(12):5003-8

Ashwell M, Gibson S. Waist-to-height ratio as an indicator of 'early health risk': simpler and more predictive than using a 'matrix' based on BMI and waist circumference. BMJ Open. 2016 Mar 14;6(3):e010159

Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. RNA. 2005 Mar;11(3):241-7

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004 Jan 23;116(2):281-97

Barton M, Carmona R, Morawietz H, d'Uscio LV, Goettsch W, Hillen H, Haudenschild CC, Krieger JE, Münter K, Lattmann T, Lüscher TF, Shaw S. Obesity is associated with tissue-specific activation of renal angiotensin-converting enzyme in vivo: evidence for a regulatory role of endothelin. Hypertension. 2000 Jan;35(1 Pt 2):329-36

Bastien M, Poirier P, Lemieux I, Després JP. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. Prog Cardiovasc Dis. 2014 Jan-Feb;56(4):369-81

Bays HE, González-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB, Rodbard HW, Henry RR. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. Expert Rev Cardiovasc Ther. 2008 Mar;6(3):343-68

Bays HE. Adiposopathy is "sick fat" a cardiovascular disease? J Am Coll Cardiol. 2011 Jun 21;57(25):2461-73

Bentley-Lewis R, Adler GK, Perlstein T, Seely EW, Hopkins PN, Williams GH, Garg R. Body mass index predicts aldosterone production in normotensive adults on a high-salt diet. J Clin Endocrinol Metab. 2007 Nov;92(11):4472-5

Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, Andreasen D, Mouritzen P, Wrang Teilum M, Dahlsveen IK. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. Methods. 2013 Jan;59(1):S1-6

Booth ML, Hunter C, Gore CJ, Bauman A, Owen N. The relationship between body

mass index and waist circumference: implications for estimates of the population prevalence of overweight. Int J Obes Relat Metab Disord. 2000 Aug;24(8):1058-61

Bombelli M, Facchetti R, Sega R, Carugo S, Fodri D, Brambilla G, Giannattasio C, Grassi G, Mancia G. Impact of body mass index and waist circumference on

the long-term risk of diabetes mellitus, hypertension, and cardiac organ damage. Hypertension. 2011 Dec; 58(6):1029-35

Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, Chavakis E, Potente M, Tjwa M, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. Science. 2009 Jun 26;324(5935):1710-3

Bork-Jensen J, Thuesen AC, Bang-Bertelsen CH, Grunnet LG, Pociot F, Beck-Nielsen H, Ozanne SE, Poulsen P, Vaag A. Genetic versus Non-Genetic Regulation of miR-103, miR-143 and miR-483-3p Expression in Adipose Tissue and Their Metabolic Implications-A Twin Study. Genes (Basel). 2014 Jul 9;5(3):508-17

Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Højlund K, Gygi SP, Spiegelman BM. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brownfat-like development of white fat and thermogenesis. Nature. 2012 Jan 11;481(7382):463-8

Brenner DR, Tepylo K, Eny KM, Cahill LE, El-Sohemy A. Comparison of body mass index and waist circumference as predictors of cardiometabolic health in a population of young Canadian adults. Diabetol Metab Syndr. 2010 May 12;2(1):28

Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulatesthe proapoptotic gene hid in Drosophila. Cell. 2003 Apr 4;113(1):25-36

Burgos KL, Van Keuren-Jensen K. RNA isolation for small RNA Next-generation Sequencing from acellular biofluids. Methods Mol Biol. 2014;1182:83-92

Busutil R, Espallardo O, Torres A, Martínez-Galdeano L, Zozaya N, Hidalgo-Veja Á. The impact of obesity on health-related quality of life in Spain. Health Qual Life Outcomes. 2017 Oct 10;15(1):197

Cai L, He J, Song Y, Zhao K, Cui W. Association of obesity with socio-economic factors and obesity-related chronic diseases in rural southwest China. PublicHealth. 2013 Mar;127(3):247-51

Caman OK, Calling S, Midlöv, P Calling, S, Midlöv P, Sundquist, J. Sundquist K. Johansson SK Longitudinal age-and cohort trends in body mass index in Sweden – a 24-year follow-up study. BMC Public Health. 2013, December, 13:893

Carr MC, Brunzell JD. Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrome: importance of type 2 diabetes and familial combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Jun;89(6):2601-7

Carraro JC, Hermsdorff HH, Puchau B, Zulet MÁ, Milagro FI, Bressan J, Martínez JA. Interleukin-6 is a better metabolic biomarker than interleukin-18 in younghealthy adults. J Physiol Biochem. 2015 Sep;71(3):527-35

Carreras-Badosa G, Bonmatí A, Ortega FJ, Mercader JM, Guindo-Martínez M, Torrents D, Prats-Puig A, Martinez-Calcerrada JM, Platero-Gutierrez E, De Zegher F, Ibáñez L, Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Bassols J. Altered Circulating miRNA Expression Profile in Pregestational and Gestational Obesity. J Clin Endocrinol Metab. 2015 Nov;100(11):E1446-56.

Carvalho DF, Paiva AA, Melo AO, Ramos, AT, Medeiros, JS, Medeiros CC, Muniz-Cardoso MAA. Perfil lipídico e estado nutricional de adolescentes Revista Brasileira de Epidemiologia, 2007 Dez; 10(4), 491-498.

Celoria BM, Genelhu VA, Pimentel Duarte SF, Delfraro PA, Francischetti EA. Hypoadiponectinemia is associated with prehypertension in obese individuals of multiethnic origin. Clin Cardiol. 2010 Jun;33(6):E61-5

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q,Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R,Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. Cell Res. 2008 Oct;18(10):997-1006

Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus-present and future perspectives. Nat Rev Endocrinol. 2011 Nov8;8(4):228-36

Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. Clin Chem. 2008 Mar;54(3):482-90

Costa MC, Leitão AL, Enguita FJ. MicroRNA profiling in plasma or serum using quantitative RT-PCR. Methods Mol Biol. 2014;1182:121-9

Costa JV, Duarte JS. [Adipose tissue and adipokines]. Acta Med Port. 2006 May-Jun;19(3):251-6

Cowley AW, Nadeau JH, Baccarelli A, Berecek K, Fornage M, Gibbons GH, Harrison DG, Liang M, Nathanielsz PW, O'Connor DT, Ordovas J, Peng W, Soares MB, Szyf M, Tolunay HE, Wood KC, Zhao K, Galis ZS. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group on Epigenetics and Hypertension Hypertension 2012 May; 59:899-905

Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. Mol Cell. 2004 Dec 22;16(6):861-5

Da Costa LA, Arora P, García-Bailo B, Karmali M, El-Sohemy A, Badawi A. The association between obesity, cardiometabolic disease biomarkers, and innate immunity-related inflammation in Canadian adults. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2012 Oct; 5:347-55.

Dalmay T. MicroRNAs and cancer. J Intern Med. 2008 Apr;263(4):366-75

Danaei G, Ding EL, Mozaffarian D, Taylor B, Rehm J, Murray CJ, Ezzati M. The preventable causes of death in the United States: comparative risk assessment of dietary, lifestyle, and metabolic risk factors. PLoS Med. 2009 Apr 28;6(4): e1000058

Davuluri RV, Suzuki Y, Sugano S, Zhang MQ. CART classification of human 5' UTR sequences. *Genome Res.* 2000 Nov;10(11):1807-16

Dews M, Fox JL, Hultine S, Sundaram P, Wang W, Liu YY, Furth E, Enders GH, El-Deiry W, Schelter JM, Cleary MA, Thomas-Tikhonenko A. The myc-miR-17~92 axis blunts TGF {beta} signaling and production of multiple TGF {beta}-dependent antiangiogenic factors. *Cancer Res.* 2010 Oct 15;70(20):8233-46.

Dhawan S, Dirice E, Kulkarni RN, Bhushan A. Inhibition of TGF- $\beta$  Signaling Promotes Human Pancreatic  $\beta$ -Cell Replication. Diabetes. 2016 May;65(5):1208-18

Dixon JB. The effect of obesity on health outcomes. Mol Cell Endocrinol. 2010 Mar 25;316(2)

Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. Diabetes Res Clin Pract. 2011 Aug;93 Suppl 1: S52-9.

Donkin I, Versteyhe S, Ingerslev LR, Qian K, Mechta M, Nordkap L, Mortensen B, Appel EV, Jørgensen N, Kristiansen VB, Hansen T, Workman CT, Zierath JR, Barrès R. Obesity and Bariatric Surgery Drive Epigenetic Variation of Spermatozoa in Humans. Cell Metab. 2016 Feb 9;23(2):369-78

Droyvold WB, Midthjell K, Nilsen TI, Holmen J. Change in body mass index and its impact on blood pressure: a prospective population study. *Int J Obes.* 2005; 29: 650–5.

El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, van Obberghen E. miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2008 Oct;57(10):2708-17.

Ellis KL, Cameron VA, Troughton RW, Frampton CM, Ellmers LJ, Richards AM.Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. Eur J Heart Fail. 2013 Oct;15(10):1138-47

Elzenaar I, Pinto YM, van Oort RJ. MicroRNAs in heart failure: new targets in disease management. Clin Pharmacol Ther. 2013 Oct;94(4):480-9

Ellwanger DC, Büttner FA, Mewes HW, Stümpflen V. The sufficient minimal set of miRNA seed types. *Bioinformatics*. 2011 May 15;27(10):1346-50.

Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, Sun Y, KooS, Perera RJ, Jain R, Dean NM, Freier SM, Bennett CF, Lollo B, Griffey R. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. J Biol Chem. 2004 Dec10;279(50):52361-5

Esler M, Straznicky N, Eikelis N, Masuo K, Lambert G, Lambert E. Mechanisms of sympathetic activation in obesity-related hypertension. Hypertension. 2006 Nov;48(5):787-96

Farina NH, Wood ME, Perrapato SD, Francklyn CS, Stein GS, Stein JL, Lian JB. Standardizing analysis of circulating microRNA: clinical and biological relevance. *J Cell Biochem.* 2014 May;115(5):805-11.

Fernández-Bergés D, Consuegra-Sánchez L, Peñafiel J, Cabrera de León A, VilaJ, Félix-Redondo FJ, Segura-Fragoso A, Lapetra J, Guembe MJ, Vega T, Fitó M, Elosua R, Díaz O, Marrugat J. Metabolic and inflammatory profiles of biomarkers in obesity, metabolic syndrome, and diabetes in a Mediterranean population. DARIOS Inflammatory study. Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2014 Aug;67(8):624-31

Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Röxe T, Müller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. Circ Res. 2010 Sep 3;107(5):677-84.

Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, Singh GM, Gutierrez HR, Lu Y, Bahalim AN, Farzadfar F, Riley LM, Ezzati M; Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Body Mass Index). National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9-1 million participants. Lancet. 2011 Feb 12;377(9765):557-67

Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of Obesity and Trends in the Distribution of Body Mass Index Among US Adults, 1999-2010. *JAMA*. Feb 1;307(5):491-7

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

Fryar CD, Hughes JP, Herrick KA, Ahluwalia N. Fast Food Consumption Among Adults in the United States, 2013-2016. NCHS Data Brief. 2018 Oct;(322):1-8

Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. Mol Cell Endocrinol. 2010 Mar 25;316(2):129-39

Gantier MP, McCoy CE, Rusinova I, Saulep D, Wang D, Xu D, Irving AT, Behlke MA, Hertzog PJ, Mackay F, Williams BR. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. Nucleic Acids Res. 2011 Jul;39(13):5692-703

Gauthier BR, Wollheim CB. MicroRNAs: 'ribo-regulators' of glucose homeostasis. Nat Med. 2006 Jan;12(1):36-8

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

Geloneze B, Repetto EM Geloneze SR, Tambascia MA, Ermetice MN. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixtured population IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. Diabetes Res Clin Pract. 2006; 72: 219–20.

Genelhu VA, Celoria BM, Duarte SF, Cabello PH, Francischetti EA. Not all obese subjects of multiethnic origin are at similar risk for developing hypertensionand type 2 diabetes. Eur J Intern Med. 2009 May;20(3):289-95.

Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. Nat Cell Biol. 2009 Sep;11(9):1143-9. doi: 10.1038/ncb1929. Epub 2009 Aug 16. Erratum in: Nat Cell Biol. 2009 Oct;11(10):1272.

Global Burden of Disease Study 2015 (GBD 2015) Obesity and Overweight Prevalence 1980-2015 < Disponível em <a href="http://ghdx.healthdata.org/record/global-burden-disease-study-2015-gbd-2015-obesity-and-overweight-prevalence-1980-2015 Acesso abril 2019">http://ghdx.healthdata.org/record/global-burden-disease-study-2015-gbd-2015-obesity-and-overweight-prevalence-1980-2015 Acesso abril 2019</a>

Goguet-Rubio P, Klug RL, Sharma DL, Srikanthan K, Puri N, Lakhani VH, Nichols A, O'Hanlon KM, Abraham NG, Shapiro JI, Sodhi K. Existence of a Strong Correlation of Biomarkers and miRNA in Females with Metabolic Syndrome and Obesity in a Population of West Virginia. Int J Med Sci. 2017 Apr19;14(6):543-553

Gómez-Ambrosi J, Silva C, Galofré JC, Escalada J, Santos S, Gil MJ, Valentí V, Rotellar F, Ramírez B, Salvador J, Frühbeck G. Body adiposity and type 2 diabetes: increased risk with a high body fat percentage even having a normal BMI. Obesity (Silver Spring). 2011 Jul;19(7):1439-44.

Goossens GH. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. Physiol Behav. 2008 May 23;94(2):206-18.

Gonzalez-Quintela A, Alende R, Gude F, Campos J, Rey J, Meijide LM, Fernandez-Merino C, Vidal C. Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in ageneral adult population and their relationship with alcohol consumption, smokingand common metabolic abnormalities. Clin Exp Immunol. 2008 Jan;151(1):42-50

Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. Annu Rev

Immunol. 2011;29:415-45

Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. Nat Rev Endocrinol. 2013 Sep;9(9):513-21

Haidar YM, Cosman BC. Obesity epidemiology. Clin Colon Rectal Surg. 2011 Dec;24(4):205-10.

Hall JE, do Carmo JM, da Silva AA, Wang Z, Hall ME. Obesity-induced hypertension: interaction of neurohumoral and renal mechanisms. Circ Res. 2015 Mar 13;116(6):991-1006

Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. Nat Med. 2013 Oct;19(10):1252-63

Harris K, Kassis A, Major G, Chou CJ. Is the gut microbiota a new fator contributing to obesity and its metabolic disorders? J Obes. 2012; 2012:879151

He Q, Gao Z, Yin J, Zhang J, Yun Z, Ye J. Regulation of HIF-1{alpha} activity in adipose tissue by obesity-associated factors: adipogenesis, insulin, and hypoxia. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2011 May;300(5):E877-85

Heitmann BL, Frederiksen P, Lissner L. Hip circumference and cardiovascular morbidity and mortality in men and women. Obes Res. 2004 Mar;12(3):482-7

Heneghan HM, Miller N, McAnena OJ, O'Brien T, Kerin MJ. Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. J Clin Endocrinol Metab. 2011 May;96(5):E846-50

Higuchi C, Nakatsuka A, Eguchi J, Teshigawara S, Kanzaki M, Katayama A,Yamaguchi S, Takahashi N, Murakami K, Ogawa D, Sasaki S, Makino H, Wada J.Identification of circulating miR-101, miR-375 and miR-802 as biomarkers for type 2 diabetes. Metabolism. 2015 Apr;64(4):489-97.

Hilton C, Neville MJ, Karpe F. MicroRNAs in adipose tissue: their role in adipogenesis and obesity. Int J Obes (Lond). 2013 Mar;37(3):325-32

Hinton A, Hunter S, Reyes G, Fogel GB, King CC. From pluripotency to islets:miRNAs as critical regulators of human cellular differentiation. Adv Genet.2012;79:1-34.

Hocking SL, Wu LE, Guilhaus M, Chisholm DJ, James DE. Intrinsic depotspecific differences in the secretome of adipose tissue, preadipocytes, and adipose tissue-derived microvascular endothelial cells. Diabetes. 2010 Dec;59(12):3008-16

Hossain P, Kawar B, El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. N Engl J Med. 2007 Jan 18;356(3):213-5

Hsieh CH, Rau CS, Wu SC, Yang JC, Wu YC, Lu TH, Tzeng SL, Wu CJ, Lin CW. Weight-reduction through a low-fat diet causes differential expression of circulating microRNAs in obese C57BL/6 mice. BMC Genomics. 2015 Sep 16; 16:699.

Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. Int J Cancer. 2010 Jul 1;127(1):118-26

International Diabetes Federation - Diabetes atlas 8th edition (2017). Disponivel em :< <a href="https://www.idf.org/">https://www.idf.org/</a> > (acesso em março de 2019)

Jacobsen BK, Aars NA. Changes in body mass index and the prevalence of obesity during 1994-2008: repeated cross-sectional surveys and longitudinal analyses. The Tromsø Study. BMJ Open. 2015 Jun 12;5(6):e007859

Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R. Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk. Am J Clin Nutr. 2004 Mar;79(3):379-84.

Jiang S, Li C, Olive V, Lykken E, Feng F, Sevilla J, Wan Y, He L, Li QJ. Molecular dissection of the miR-17-92 cluster's critical dual roles in promoting Th1 responses and preventing inducible Treg differentiation. *Blood.* 2011 Nov 17;118(20):5487-97

Johnson RJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Shafiu M, Sundaram S, Le M, Ishimoto T, Sautin YY, Lanaspa MA. Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. Diabetes. 2013 Oct;62(10):3307-15.

Kachur S, Morera R, De Schutter A, Lavie CJ. Cardiovascular Risk in Patient swith Prehypertension and the Metabolic Syndrome. Curr Hypertens Rep. 2018 Mar6;20(2):15

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. J Clin Invest. 2006 Jul;116(7):1784-92

Kajimura S, Seale P, Spiegelman BM. Transcriptional control of brown fat development. Cell Metab. 2010 Apr 7;11(4):257-62 Karelis AD. Metabolically healthy but obese individuals. Lancet. 2008 Oct 11;372(9646):1281-3.

Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A, Sepramaniam S, Pek SL, Wong MT, Lim SC, Sum CF, Jeyaseelan K. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2012 Dec;97(12):E2271-6.

Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNAbiomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). Methods. 2010 Apr;50(4):298-301.

Klein S, Allison DB, Heymsfield SB, Kelley DE, Leibel RL, Nonas C, Kahn R; Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, The ObesitySociety; American Society for Nutrition; American Diabetes Association. Waistcircumference and cardiometabolic risk: a consensus statement from ShapingAmerica's Health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, The Obesity Society; the

American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association. Am J Clin Nutr. 2007 May;85(5):1197-202

Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. Dev Cell. 2006 Oct;11(4):441-50

Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, Moulton JD, Plasterk RH. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol.* 2007 Aug;5(8): e203.

Klöting N, Berthold S, Kovacs P, Schön MR, Fasshauer M, Ruschke K, Stumvoll M,Blüher M. MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue.PLoS One. 2009 Mar;4(3):e4699

Kotchen TA. Obesity-related hypertension: epidemiology, pathophysiology, and clinical management. Am J Hypertens. 2010 Nov;23(11):1170-8.

Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. Nucleic Acids Res. 2011 Jan;39(Database issue):D152-7

Kwok KH, Lam KS, Xu A. Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. Exp Mol Med. 2016 Mar 11;48:e215

Kwon H, Pessin JE. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. Front Endocrinol (Lausanne). 2013 Jun 12;4:71.

Lahti-Koski M, Harald K, Männistö S, Laatikainen T, Jousilahti P. Fifteen-year changes in body mass index and waist circumference in Finnish adults. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. 2007 Jun;14(3):398-404

Lamounier-Zepter V, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Insulin resistance in hypertension and cardiovascular disease. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.2006 Sep;20(3):355-67

Latreille M, Herrmanns K, Renwick N, Tuschl T, Malecki MT, McCarthy MI, Owen KR, Rülicke T, Stoffel M. miR-375 gene dosage in pancreatic  $\beta$ -cells: implications for regulation of  $\beta$ -cell mass and biomarker development. *J Mol Med (Berl)*. 2015 Oct;93(10):1159-69.

Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boultwood J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL. etection ofelevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. Br J Haematol. 2008 May;141(5):672-5

Lean ME, Katsarou C, McLoone P, Morrison DS. Changes in BMI and waist circumference in Scottish adults: use of repeated cross-sectional surveys to explore multiple age groups and birth-cohorts. Int J Obes (Lond). 2013 Jun;37(6):800-8

- Lee MJ, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med*. 2013 Feb;34(1):1–11. doi:10.1016/j.mam.2012.10.001
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell. 1993 Dec 3;75(5):843-54
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004 Oct 13;23(20):4051-60
- Lee YS, Li P, Huh JY, Hwang IJ, Lu M, Kim JI, Ham M, Talukdar S, Chen A, Lu WJ, Bandyopadhyay GK, Schwendener R, Olefsky J, Kim JB. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. Diabetes. 2011 Oct;60(10):2474-83
- Lekchnov EA, Zaporozhchenko IA, Morozkin ES, Bryzgunova OE, Vlassov VV, Laktionov PP. Protocol for miRNA isolation from biofluids. Anal Biochem. 2016 Apr 15;499:78-84
- Levelt E., Pavlides M., Banerjee R., Mahmod M., Kelly C., Sellwood J., Ariga R., Thomas S., Francis J., Rodgers C., Clarke W., Sabharwal N., Antoniades C., Schneider J., Robson M., Clarke K., Karamitsos T., Rider O., Neubauer S. Ectopic and Visceral Fat Deposition in Lean and Obese Patients With Type 2 Diabetes J Am Coll Cardiol. 2016 Jul 5; 68(1): 53–63.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell.2005 Jan 14;120(1):15-20
- Li Y, Xu X, Liang Y, Liu S, Xiao H, Li F, Cheng H, Fu Z. miR-375 enhances palmitate-induced lipoapoptosis in insulin-secreting NIT-1 cells byrepressing myotrophin (V1) protein expression. Int J Clin Exp Pathol. 2010 Jan25;3(3):254-64.
- Li M, Liu Z, Zhang Z, Liu G, Sun S, Sun C. miR-103 promotes 3T3-L1 cell adipogenesis through AKT/mTOR signal pathway with its target being MEF2D. BiolChem. 2015 Mar;396(3):235-44.
- Li C, Pei F, Zhu X, Duan DD, Zeng C. Circulating microRNAs as novel and sensitive biomarkers of acute myocardial Infarction. *Clin Biochem.* 2012 Jul;45(10-11):727-32.
- Li H, Li T, Wang S, Wei J, Fan J, Li J, Han Q, Liao L, Shao C, Zhao RC. miR-17-5p and miR-106a are involved in the balance between osteogenic andadipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. Stem CellRes. 2013 May;10(3):313-24
- Li Y, Li Z, Zhou S, Wen J, Geng B, Yang J, Cui Q. Genome-wide analysis ofhuman microRNA stability. Biomed Res Int. 2013 Aug; 2013:368975
- Li X. miR-375, a microRNA related to diabetes. Gene. 2014 Jan 1;533(1):1-4.

Lim S. M., Choi D. P., Rhee Y., Kim H. C. Association between obesity indices and insulin resistance among healthy Korean adolescents: the JS high school study. *PLoS One*. 2015 May 13;10(5):e0125238

Ling HY, Wen GB, Feng SD, Tuo QH, Ou HS, Yao CH, Zhu BY, Gao ZP, Zhang L, Liao DF. MicroRNA-375 promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through modulation of extracellular signal-regulated kinase signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2011 Apr;38(4):239-46

Ling C, Groop L. Epigenetics: A molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. Diabetes. 2009 Dec;58(12):2718-25

Liu J, Mao Q, Liu Y, Hao X, Zhang S, Zhang J. Analysis of miR-205 and miR-155 expression in the blood of breast cancer patients. Chin J Cancer Res. 2013Feb;25(1):46-54

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

Lontchi-Yimagou E, Sobngwi E, Matsha TE, Kengne AP. Diabetes mellitus and inflammation. Curr Diab Rep. 2013 Jun;13(3):435-44

Lukic L, Lalic NM, Rajkovic N, Jotic A, Lalic K, Milicic T, Seferovic JP, Macesic M, Gajovic JS. Hypertension in obese type 2 diabetes patients is associated with increases in insulin resistance and IL-6 cytokine levels: potential targets for an efficient preventive intervention. Int J Environ Res Public Health. 2014 Mar 28;11(4):3586-98

Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2011 Jun;121(6):2111-7.

Maloyan A, Muralimanoharan S, Huffman S, Cox LA, Nathanielsz PW, Myatt L, Nijland MJ. Identification and comparative analyses of myocardial miRNAs involved in the fetal response to maternal obesity. Physiol Genomics. 2013 Oct 1;45(19):889-900

Marcelis CL, Hol FA, Graham GE, Rieu PN, Kellermayer R, Meijer RP, Lugtenberg D, Scheffer H, van Bokhoven H, Brunner HG, de Brouwer AP. Genotype-phenotype correlations in MYCN-related Feingold syndrome. Hum Mutat. 2008 Sep;29(9):1125-32

Mariner PD, Korst A, Karimpour-Fard A, Stauffer BL, Miyamoto SD, Sucharov CC. Improved Detection of Circulating miRNAs in Serum and Plasma Following Rapid Heat/Freeze Cycling. Microrna. 2018;7(2):138-147

Marsit CJ, Eddy K, Kelsey KT. MicroRNA responses to cellular stress. CancerRes. 2006 Nov 15;66(22):10843-8

Martinez JA, Parra MD, Santos JL, Moreno-Aliaga MJ, Marti A, Martinez-Gonzalez MA. Genotype-dependent response to energy-restricted diets in

obese subjects:towards personalized nutrition. Asia Pac J Clin Nutr. 2008;17 Suppl 1:119-22.

Marzi MJ, Ghini F, Cerruti B, de Pretis S, Bonetti P, Giacomelli C, Gorski MM, Kress T, Pelizzola M, Muller H, Amati B, Nicassio F. Degradation dynamics of microRNAs revealed by a novel pulse-chase approach. Genome Res. 2016 Apr;26(4):554-65

Matsuzawa Y. Therapy Insight: adipocytokines in metabolic syndrome and relatedcardiovascular disease. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2006 Jan;3(1):35-42 and metabolic syndrome, Molecular and Cellular Endocrinology. 2010 Jan 15;314(1):1-16

Menke A, Muntner P, Wildman RP, Reynolds K, He J. Measures of adiposity and cardiovascular disease risk factors. Obesity (Silver Spring). 2007 Mar;15(3):785-95

Midthjell K, Lee CM, Langhammer A, Krokstad S, Holmen TL, Hveem K, Colagiuri S, Holmen J. Trends in overweight and obesity over 22 years in a large adultpopulation: the HUNT Study, Norway. Clin Obes. 2013 Feb;3(1-2):12-20

Ministério da Saúde. Mais da metade dos adultos estão acima do peso 2015. <a href="http://legado.brasil.gov.br/noticias/saude/2015/08/mais-da-metade-dos-adultos-estao-acima-do-peso">http://legado.brasil.gov.br/noticias/saude/2015/08/mais-da-metade-dos-adultos-estao-acima-do-peso</a> (Acesso em 29 de junho de 2019)

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable bloodbased markers for cancer detection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jul 29;105(30):10513-8

Mitchell AJ, Gray WD, Hayek SS, Ko YA, Thomas S, Rooney K, Awad M, Roback JD, Quyyumi A, Searles CD. Platelets confound the measurement of extracellular miRNA in archived plasma. Sci Rep. 2016 Sep 13; 6:32651.

Moldovan L, Batte KE, Trgovcich J, Wisler J, Marsh CB, Piper M. Methodologica Ichallenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. J Cell Mol Med. 2014 Mar;18(3):371-90.

Moncini S, Salvi A, Zuccotti P, Viero G, Quattrone A, Barlati S, De Petro G, Venturin M, Riva P. The role of miR-103 and miR-107 in regulation of CDK5R1expression and in cellular migration. PLoS One. 2011 May;6(5): e20038

Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. Mediators Inflamm. 2010 Jul;2010. pii: 289645

Morris DR, AP. Geballe AP Upstream Open Reading Frames as Regulators of mRNA Translation Mol Cell Biol. 2000 Dec; 20(23): 8635–8642

brown adipose tissue in adult humans. Am J Physiol Endocrinol Metab 2007 Aug;293(2):E444-52

Nedergaard J, Cannon B. The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. Cell Metab. 2010 Apr 7;11(4):268-72

Nelson PT, Hatzigeorgiou AG, Mourelatos Z. miRNP: mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line. RNA. 2004 Mar;10(3):387-94

Ng M. Fleming T. Robinson M. Thomson B. Graetz N. Margono C. Mullany EC, Biryukov S, Abbafati C, Abera SF, Abraham JP, Abu-Rmeileh NM, Achoki T,AlBuhairan FS, Alemu ZA, Alfonso R, Ali MK, Ali R, Guzman NA, Ammar W, Anwari P, Banerjee A, Barguera S, Basu S, Bennett DA, Bhutta Z, Blore J. Cabral N. Nonato IC, Chang JC, Chowdhury R, Courville KJ, Criqui MH, Cundiff DK, Dabhadkar KC, Dandona L, Davis A, Dayama A, Dharmaratne SD, Ding EL, Durrani AM, Esteghamati A, Farzadfar F, Fay DF, Feigin VL, Flaxman A, Forouzanfar MH, Goto A, Green MA, Gupta R, Hafezi-Nejad N, Hankey GJ, Harewood HC, Havmoeller R, Hay S, Hernandez L, Husseini A, Idrisov BT, Ikeda N, Islami F, Jahangir E, Jassal SK, Jee SH, Jeffreys M, Jonas JB, Kabagambe EK, Khalifa SE, Kengne AP, Khader YS, Khang YH,Kim D, Kimokoti RW, Kinge JM, Kokubo Y, Kosen S, Kwan G, Lai T, Leinsalu M, Li Y, Liang X, Liu S, Logroscino G, Lotufo PA, Lu Y, Ma J, Mainoo NK, Mensah GA, Merriman TR, Mokdad AH, Moschandreas J, Naghavi M, Naheed A, Nand D, Narayan KM, Nelson EL, Neuhouser ML, Nisar MI, Ohkubo T. Oti SO. Pedroza A. Prabhakaran D.Rov N. Sampson U. Seo H. Sepanlou SG, Shibuya K, Shiri R, Shiue I, Singh GM, Singh JA, Skirbekk V, Stapelberg NJ, Sturua L, Sykes BL, Tobias M, Tran BX, Trasande L, Toyoshima H, van de Vijver S, Vasankari TJ, Veerman JL, Velasquez-Melendez G, Vlassov VV, Vollset SE, Vos T, Wang C, Wang X, WeiderpassE, Werdecker A, Wright JL, Yang YC, Yatsuya H, Yoon J, Yoon SJ, Zhao Y, Zhou M,Zhu S, Lopez AD, Murray CJ, Gakidou E. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet. 2014 Aug 30;384(9945):766-81.

Popkin BM, Adair LS, Shu Wen Ng Now and then: The Global Nutrition Transition: The Pandemic of Obesity in Developing Countries Nutr Rev. 2012 Jan; 70(1): 3–21.

Odegaard JI, Chawla A. Pleiotropic actions of insulin resistance and and an in metabolic homeostasis. Science. 2013 Jan 11;339(6116):172-7.

Ogawa R, Tanaka C, Sato M, Nagasaki H, Sugimura K, Okumura K, Nakagawa Y, Aoki N. Adipocyte-derived microvesicles contain RNA that is transported intomacrophages and might be secreted into blood circulation. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Aug 6;398(4):723-9.

Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. JAMA. 2006 Apr 5;295(13):1549-55.

Ogden CL, Carrol MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. *JAMA* 2014 Feb 26;311(8):806-14

Ohlson LO, Larsson B, Svärdsudd K, Welin L, Eriksson H, Wilhelmsen L, Björntorp P, Tibblin G. The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. Diabetes. 1985 Oct;34(10):1055-8

Okura T, Nakata Y, Yamabuki K, Tanaka K. Regional body composition changes exhibit opposing effects on coronary heart disease risk factors. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 May;24(5):923-9. Orava J, Nuutila P, Lidell ME, Oikonen V, Noponen T, Viljanen T, Scheinin M, Taittonen M, Niemi T, Enerbäck S, Virtanen KA. Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. Cell Metab. 2011 Aug 3;14(2):272-9

Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. Annu Rev Physiol. 2010; 72:219–46.

Orava J, Nuutila P, Lidell ME, Oikonen V, Noponen T, Viljanen T, Scheinin M, Taittonen M, Niemi T, Enerbäck S, Virtanen KA. Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. Cell Metab. 2011 Aug 3;14(2):272-9

Pajunen P, Vartiainen E, Männistö S, Jousilahti P, Laatikainen T, Peltonen M. Intra-individual changes in body weight in population-based cohorts during fourdecades: the Finnish FINRISK study. Eur J Public Health. 2012 Feb;22(1):107-12

Peirce V, Carobbio S, Vidal-Puig A. The different shades of fat. Nature. 2014 Jun 5;510(7503):76-83

Pescador N, Pérez-Barba M, Ibarra JM, Corbatón A, Martínez-Larrad MT, Serrano-Ríos M. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers. PLoS One. 2013 Oct 15;8(10): e77251

Poel D, Buffart TE, Oosterling-Jansen J, Verheul HM, Voortman J. Evaluation of several methodological challenges in circulating miRNA qPCR studies in patients with head and neck cancer. *Exp Mol Med.* 2018 Mar 9;50(3): e454

Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S,Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. Nature. 2004 Nov 11;432(7014):226-30

Poy MN, Hausser J, Trajkovski M, Braun M, Collins S, Rorsman P, Zavolan M, Stoffel M. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. ProcNatl Acad Sci U S A. 2009 Apr 7;106(14):5813-8

Popkin, Barry M., Linda S. Adair, and Shu Wen Ng. "Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries." Nutrition 2012 Jan;70(1):3-21

Primo L, di Blasio L, Roca C, Droetto S, Piva R, Schaffhausen B, Bussolino F. Essential role of PDK1 in regulating endothelial cell migration. *J Cell Biol.* 2007 Mar 26;176(7):1035-47

Pritchard CC, Kroh E, Wood B, Arroyo JD, Dougherty KJ, Miyaji MM, Tait JF, Tewari M. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note forcancer biomarker studies. Cancer Prev Res (Phila). 2012 Mar;5(3):492-497

Qi R, Weiland M, Gao XH, Zhou L, Mi QS. Identification of endogenous normalizers for serum microRNAs by microarray profiling: U6 small nuclear RNA is not a reliable normalizer. Hepatology. 2012 May;55(5):1640-2

Rahmouni K, Correia ML, Haynes WG, Mark AL. Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. Hypertension 2005 Jan;45(1):9-14

Reaven GM. Insulin resistance/compensatory hyperinsulinemia, essential hypertension, and cardiovascular disease. J Clin Endocrinol Metab 2003 Jun;88(6):2399-403

Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. Gynecol Oncol. 2009 Jan;112(1):55-9

Rexrode KM, Carey VJ, Hennekens CH, Walters EE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Manson JE. Abdominal Adiposity and Coronary Heart Disease in Women. *JAMA*. 1998 Dec 2;280(21):1843-8.

Rojas A, Padidam M, Cress D, Grady WM. TGF-beta receptor levels regulate thespecificity of signaling pathway activation and biological effects of TGF-beta. Biochim Biophys Acta. 2009 Jul;1793(7):1165-73

Romieu I, Dossus L, Barquera S, Blottière HM, Franks PW, Gunter M, Hwalla N, Hursting SD, Leitzmann M, Margetts B, Nishida C, Potischman N, Seidell J, StepienM, Wang Y, Westerterp K, Winichagoon P, Wiseman M, Willett WC; IARC working groupon Energy Balance and Obesity. Energy balance and obesity: what are the maindrivers? Cancer Causes Control. 2017 Mar;28(3):247-258

Rothwell NJ, Stock MJ. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. Nature. 1979 Sep 6;281(5726):31-5

Rüegger S, Großhans H. MicroRNA turnover: when, how, and why. Trends Biochem Sci. 2012 Oct;37(10):436-46

Rui L. Energy metabolism in the liver. Compr Physiol. 2014 Jan;4(1):177-97.

Ryan MJ. An update on immune system activation in the pathogenesis of hypertension. Hypertension. 2013 Aug;62(2):226-30

Saely CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus white adipose tissue: a minireview. Gerontology 2012;58(1):15-23

Sakaguchi M, Isono M, Isshiki K, Sugimoto T, Koya D, Kashiwagi A. Inhibitionof mTOR signaling with rapamycin attenuates renal hypertrophy in the earlydiabetic mice. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Feb 3;340(1):296-301

Sales VM, Ferguson-Smith AC, Patti ME. Epigenetic Mechanisms of Transmission of Metabolic Disease Across Generations. Cell Metab. 2017 March 07; 25(3): 559–571

Samanic C, Chow W.H, Gridley G, Jarvholm B, Fraumeni J.F. Relation of body mass index to cancer risk in 362,552 *Swedish men. Cancer Causes Control* 2006 Sep;17(7):901-9.

Samaras K, Botelho NK, Chisholm DJ, Lord RV. Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. Obesity (Silver Spring). 2010 May;18(5):884-9

Schäffler A, Schölmerich J. Innate immunity and adipose tissue biology. Trends in Immunology 2010 Jun;31(6):228-35

Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. 2008. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Investig.* 2008 Sep;118(9):2992-3002.

Schmittgen TD. Regulation of microRNA processing in development, differentiation and cancer. J Cell Mol Med 2008 Oct;12(5B):1811-9

Seyhan AA, Nunez Lopez YO, Xie H, Yi F, Mathews C, Pasarica M, Pratley RE. Pancreas-enriched miRNAs are altered in the circulation of subjects with diabetes: a pilot cross-sectional study. Sci Rep. 2016 Aug 25; 6:31479.

Shamai L, Lurix E, Shen M, Novaro GM, Szomstein S, Rosenthal R, Hernandez AV, Asher CR. Association of body mass index and lipid profiles: evaluation of a broad spectrum of body mass index patients including the morbidly obese. Obes Surg. 2011 Jan;21(1):42-7

Singh SK, Bhadra MP, Girschick HJ, Bhadra U. MicroRNAs – micro in size but macro in function. FEBS Journal 2008 Oct;275(20):4929-44

Singla P, Bardoloi A, Parkash AA. Metabolic effects of obesity: A review. World J Diabetes 2010 Jul 15;1(3):76-88

Small EM, Frost RJ, Olson EN. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. Circulation 2010 Mar 2;121(8):1022-32

Sociedade Brasileira de Cardiologia. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. Disponível em:<a href="http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2017/02">http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2017/02</a> DIRETRIZ DE DISLIP IDEMIAS.pdf> Acesso em jun 2019

Sociedade Brasileira de Diabetes; Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. Disponível em: < <a href="https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf">https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf</a> > Acesso em 29 jun 2019.

Sowers JR. Diabetes mellitus and vascular disease. Hypertension. 2013 May; 61(5):943-7

Stevens VJ, Obarzanek E, Cook NR, Lee IM, Appel LJ, Smith West D, Milas NC, Mattfeldt-Beman M, Belden L, Bragg C, Millstone M, Raczynski J, Brewer A, Singh B, Cohen J; Trials for the Hypertension Prevention Research Group. Long-term weight loss and changes in blood pressure: results of the Trials of Hypertension Prevention, phase II. Ann Intern Med. 2001 Jan 2;134(1):1-11

Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. 2005. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005 Apr 9-15;365(9467):

Suárez Y, Fernández-Hernando C, Yu J, Gerber SA, Harrison KD, Pober JS, Iruela-Arispe ML, Merkenschlager M, Sessa WC. Dicer-dependent endotelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A.2008 Sep 16;105(37):14082-7

Sun Q, Van Dam RM, Spiegelman D, Heymsfield SB, Willett WC, Hu FB. Comparison of dual-energy x-ray absorption metric and anthropometric measures of adiposity in relation to adiposity-related biologic factors. Am J Epidemiol. 2010 Dec 15;172(12):1442-54

Sun BK, Tsao H. Small RNAs in development and disease. J Am Acad Dermatol, 2008 Nov;59(5):725-37

Swinburn B, Dietz W, Kleinert S. A Lancet Commission on obesity. *Lancet* 2015 Oct 31;386(10005):1716-7

Taganov KD, Boldin MP, Baltimore D. MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field. Immunity. 2007 Feb;26(2):133-7

Tsitsiou E, Lindsay MA. microRNAs and the immune response. Curr Opin Pharmacol. 2009 Aug;9(4):514-20

Tchoukalova YD, Votruba SB, Tchkonia T, Giorgadze N, Kirkland JL, Jensen MD. Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. Proc Natl Acad Sci USA 2010 Oct 19;107(42):18226-31

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol. 2007 Jun;9(6):654-9.

Vanavanan S, Srisawasdi P, Rochanawutanon M, Kumproa N, Kruthkul K, Kroll MH. Performance of body mass index and percentage of body fat in predicting cardiometabolic risk factors in Thai adults. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2018 Jun 1; 11:241-253

Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, Newman J, Bronson RT, Crowley D, Stone JR, Jaenisch R, Sharp PA, Jacks T. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92family of miRNA clusters. Cell. 2008 Mar 7;132(5):875-86.

Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D. & Remaley, A. T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. Nat. Cell Biol. 2011 Apr;13(4):423-33.

VIGITEL BRASIL. Vigilância de Fatores De Risco E Proteção Para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, 2017 <a href="https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel-brasil\_2017\_vigilancia\_fatores\_riscos.pdf">https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel\_brasil\_2017\_vigilancia\_fatores\_riscos.pdf</a> ( Acesso em jun 2019)

Villard A, Marchand L, Thivolet C, Rome S. Diagnostic Value of Cell-free Circulating MicroRNAs for Obesity and Type 2 Diabetes: A Meta-analysis J Mol Biomark Diagn. 2015 Nov; 6(6): 251.

Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine, J, Savisto, N-J, Enerbäck S, Nuutila P. Functional brown adipose tissue in healthy adults. N Engl J Med 2009 Apr 9;360(15):.

Wang K, Yuan Y, Cho JH, McClarty S, Baxter D, Galas DJ. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One*. 2012;7(7):e41561

Wang P, Mariman E, Renes J, Keijer J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. J Cell Physiol. 2008 Jul;216(1):3-13.

Wang X, Du J, Li HH. The role of miRNA-155 in cardiovascular diseases. Sheng Li Ke Xue Jin Zhan. 2013 Oct;44(5):377-80.

Wanner C, Jager KJ. Kidneys do not like excess body fat. Lancet Diabetes & Endocrinology. 2015 Sep;3(9):669-71.

Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. Clin Chem. 2010 Nov;56(11):1733-41.

Willeit P, Zampetaki A, Dudek K, Kaudewitz D, King A, Kirkby NS, Crosby-NwaobiR, Prokopi M, Drozdov I, Langley SR, Sivaprasad S, Markus HS, Mitchell JA, WarnerTD, Kiechl S, Mayr M. Circulating microRNAs as novel biomarkers for plateletactivation. Circ Res. 2013 Feb 15;112(4):595-600

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nat Cell Biol. 2009 Mar;11(3):228-34.

Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins R, Peto R. Prospective Studies Collaboration: Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. Lancet. 2009 Mar 28;373(9669):1083-96.

World Cancer Research Fund. Energy balance and body fatness, 2018. Disponível em <a href="https://www.wcrf.org/dietandcancer/energy-balance-body-fatness">https://www.wcrf.org/dietandcancer/energy-balance-body-fatness</a>> ( Acesso em jun 2019)

World Health Organization: Waist Circumference and Waist-Hip Ratio: Report of a WHO Expert Consultation. Geneva, 8–11 December 2008. 2011, Geneva: World Health Organization

World Health Organization (WHO). <u>World Obesity Federation | About obesity</u>. 2017 Disponível em: < <a href="http://www.worldobesity.org/resources/world-map-obesity/">http://www.worldobesity.org/resources/world-map-obesity/</a> (Acesso em fev. 2018)

World Obesity Federation. World Obesity Day statistics. 2015. Disponível em: <a href="http://www.worldobesity.org/whatwedo/actioninitiative/aiprogrammes/worldobesity-day/statistics/">http://www.worldobesity.org/whatwedo/actioninitiative/aiprogrammes/worldobesity-day/statistics/</a> (Acesso em março, 2019)

Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptative thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? Genes & Dev 2013; Feb 1;27(3):234-50.

Xia C, Li R, Zhang S, Gong L, Ren W, Wang Z, Li Q Lipid accumulation product is a powerful index for recognizing insulin resistance in non-diabetic individuals. *Eur J Clin Nutr.* 2012 Sep; 66(9):1035-8.

Xie H, Sun L, Lodish HF. Targeting microRNAs in obesity. Expert Opin Ther Targets. 2009. Oct;13(10):1227-38.

Xu J, Liao K. Protein kinase B/AKT 1 plays a pivotal role in insulin-like growth factor-1 receptor signaling induced 3T3-L1 adipocyte differentiation. JBiol Chem. 2004 Aug 20;279(34):35914-22.

Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA. The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. Curr Biol. 2003 Apr 29;13(9):790-5

Xu Q, Li Y, Shang YF, Wang HL, Yao MX. miRNA-103: molecular link between insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol. 2015 Jan 14;21(2):511-6.

Yang Z, Meitinger T, Midthjell K, Morken MA, Narisu N, Nilsson P, Owen KR, Payne F, Perry JR, Petersen AK, Platou C, Proenca C, Prokopenko I, Rathmann W, Rayner NW, Robertson NR, Rocheleau G, Roden M, Sampson MJ, Saxena R, Shields BM, Shrader P, Sigurdsson G, Sparso T, Strassburger K, Stringham HM, Sun Q, Swift AJ, Thorand B, Tichet J, Tuomi T, van Dam RM, van Haeften TW, van HT, van Vliet-Ostaptchouk JV, Walters GB, Weedon MN, Wijmenga C, Witteman J, Bergman RN, Cauchi S, Collins FS, Gloyn AL, Gyllensten U, Hansen T, Hide WA, , Chen X, Chen Y, Zhao Q.

Decreased irisin secretion contributes to muscle insulin resistance in high-fat diet mice. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8: 6490-7.

Xia HQ, Pan Y, Peng J, Lu GX. Over-expression of miR375 reduces glucose-induced insulin secretion in Nit-1 cells. Mol Biol Rep. 2010 Jun;38(5):3061-5.

Xiang M, Zeng Y, Yang R, Xu H, Chen Z, Zhong J, Xie H, Xu Y, Zeng X. U6 is nota suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs.Biochem Biophys Res Commun. 2014 Nov 7;454(1):210-4

Xie H, Sun L, Lodish HF. Targeting microRNAs in obesity. Expert Opin Ther Targets. 2009. Oct;13(10):1227-38.

Xu J, Liao K. Protein kinase B/AKT 1 plays a pivotal role in insulin-like growth factor-1 receptor signaling induced 3T3-L1 adipocyte differentiation. JBiol Chem. 2004 Aug 20;279(34):35914-22.

Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA. The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. Curr Biol. 2003 Apr 29;13(9):790-5

Xu Q, Li Y, Shang YF, Wang HL, Yao MX. miRNA-103: molecular link between insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol. 2015 Jan 14;21(2):511-6.

Yang Z, Meitinger T, Midthjell K, Morken MA, Narisu N, Nilsson P, Owen KR, Payne F, Perry JR, Petersen AK, Platou C, Proenca C, Prokopenko I, Rathmann W, Rayner NW, Robertson NR, Rocheleau G, Roden M, Sampson MJ, Saxena R, Shields BM, Shrader P, Sigurdsson G, Sparso T, Strassburger K, Stringham HM, Sun Q, Swift AJ, Thorand B, Tichet J, Tuomi T, van Dam RM, van Haeften TW, van HT, van Vliet-Ostaptchouk JV, Walters GB, Weedon MN, Wijmenga C, Witteman J, Bergman RN, Cauchi S, Collins FS, Gloyn AL, Gyllensten U, Hansen T, Hide WA, , Chen X, Chen Y, Zhao Q. Decreased irisin secretion contributes to muscle insulin resistance in high-fat diet mice. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Jun 1;8(6):6490-7

Yang F, Lv JH, Lei SF, Chen XD, Liu MY, Jian WX, Xu H, Tan LJ, Deng FY, Yang YJ, Wang YB, Sun X, Xiao SM, Jiang C, Guo YF, Guo JJ, Li YN, Zhu XZ, Papasian CJ, Deng HW. Receiver-operating characteristic analyses of body mass index, waist circumference and waist-to-hip ratio for obesity: Screening in young adults in central south of China. Clin Nutr. 2006 Dec; 25(6):1030-9.

Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med.* 2013 Mar;7(1):14-24.

Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, Shah A, Willeit J, Mayr M. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. Circ Res. 2010 Sep 17;107(6):810-7

Zaporozhchenko IA, Morozkin ES, Skvortsova TE, Bryzgunova OE, Bondar AA, Loseva EM Vlassov VV, Laktionov PP. A phenol-free method for isolation of microRNA from biological fluids. Anal Biochem. 2015 Jun 15; 479:43-7.

Zhang Z, Wu S, Muhammad S, Ren Q, Sun C. miR-103/107 promote ER stress-mediated apoptosis via targeting the Wnt3a/β-catenin/ATF6 pathway in preadipocytes. J Lipid Res. 2018 May;59(5):843-853.

Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. Am J Pathol. 2007 Sep;171(3):728-38

Zhang Y, Tang W, Peng L, Tang J, Yuan Z. Identification and validation of microRNAs as endogenous controls for quantitative polymerase chain reaction inplasma for stable coronary artery disease. Cardiol J. 2016;23(6):694-703.

Zhao D, Qi Y, Zheng Z, Wang Y, Zhang XY, Li HJ, Liu HH, Zhang XT, Du J, Liu J. Dietary factors associated with hypertension. Nat Rev Cardiol. 2011 Jul5;8(8):456-65.

Zhu S, Wang Z, Heshka S, Heo M, Faith MS, Heymsfield SB. Waist circumference and obesity-associated risk factors among whites in the third National Health and nutrition Examination Survey: clinical action thresholds. Am J Clin Nutr. 2002 Oct;76(4):743-9

Zhuo J, Zeng Q, Cai D, Zeng X, Chen Y, Gan H, Huang X, Yao N, Huang D, Zhang C. Evaluation of type 2 diabetic mellitus animal models via interactions between insulin and mitogen-activated protein kinase signaling pathways induced by a high fat and sugar diet and streptozotocin. *Mol Med Rep.* 2018 Apr;17(4):5132-5b

# ANEXO I – Dados demográficos, clínicos e bioquímicos da população do estudo.

Tabela I – Dados demográficos e antropométricos da população do estudo.

	_	o domogra		1		1 - 1 3	_		_
Amostra	Idade	Gênero	Raça	Altura	Peso	IMC	CC	CQ	RCQ
EU1	19	Feminino	Parda	1,60	61,100	23,87	83,0	101,0	0,82
EU4	19	Feminino	Branca	1,56	54,800	22,52	71,1	105,5	0,67
EU5	23	Feminino	Parda	1,56	48,300	19,85	69,0	93,0	0,47
EU6	28	Feminino	Branca	1,51	55,600	24,35	76,5	98,5	0,77
EU9	25	Feminino	Branca	1,62	60,300	22,83	71,5	97,0	0,74
EU10	32	Feminino	Parda	1,51	55,000	24,12	66,0	104,5	0,63
EU11	21	Feminino	Branca	1,66	63,100	22,76	70,5	97,5	0,72
EU12	21	Feminino	Branca	1,55	48,300	20,10	63,0	93,0	0,68
EU13	22	Feminino	Parda	1,65	55,100	20,24	65,0	97,0	0,67
EU14	27	Feminino	Branca	1,58	58,600	23,47	69,0	94,0	0,73
EU15	22	Feminino	Parda	1,47	50,500	23,37	60,0	96,0	0,62
EU16	36	Masculino	Branca	1,73	73,200	23,36	91,5	100	0,91
SP1	43	Feminino	Parda	1,60	67,6	26,41	82,5	104,5	0,78
SP2	36	Masculino	Branca	1,76	81,700	26,37	90,0	103,5	0,86
SP3	22	Feminino	Amarela	1,53	60,800	25,97	82,0	96,0	0,85
SP4	23	Masculino	Branca	1,77	82,800	26,43	85,5	106,0	0,81
SP5	22	Feminino	Amarela	1,61	66,000	25,30	78,5	102,5	0,76
SP6	24	Feminino	Parda	1,67	70,900	25,42	77	104,0	0,74
SP7	22	Feminino	Branca	1,57	72,300	29,14	84	109,0	0,77
SP8	44	Feminino	Parda	1,73	74,800	25,00	82	104	0,79
SP9	28	Masculino	Parda	1,79	96,000	29,96	98	113	0,86
SP10	31	Feminino	Branca	1,68	74,500	26,39	78	107	0,73
OB1	26	Masculino	Amarela	1,73	101,00	33,75	107,0	104	1,02
OB2	33	Masculino	Branca	1,63	86,400	32,52	99,5	115,5	0,90
OB3	24	Masculino	Negra	1,67	87,000	31,19	95,0	108	0,88
OB4	26	Feminino	Branca	1,67	95,600	34,26	99,0	113,5	0,87
0B5	28	Masculino	Negra	1,72	102,600	34,68	104,5	114,0	0,92
OB6	25	Feminino	Parda	1,62	90,700	34,34	85,0	125,0	0,68
ОВ7	37	Masculino	Branca	1,86	176,000	50,90	158,0	148	1,07
OB8	31	Feminino	Branca	1,68	94,900	33,62	90	129	0,69
ОВ9	21	Feminino	Branca	1,60	105,100	41,05	97	131	0,74
OB10	30	Feminino	Parda	1,57	84,500	34,3	100	120	0,83

**Legenda:** IMC, índice de massa corporal; CC, circunferência de cintura; CQ circunferência de quadril; RCQ, relação cintura-quadril.

**Tabela II -** Perfil bioquímico da população do estudo.

Amostra	TG	СТ	HDL	LDL	Uréia	Creatinina	Insulina	Glicose	HOMA-IR
EU1	62	202	65	124,6	98	0,86	12,59	98	3,04
EU4	114	203	67	113,2	12	0,91	8,01	84	1,71
EU5	65	153	69	71,0	33	0,83	5,72	88	0,77
EU6	66	135	58	63,8	20	0,83	3,31	95	1,24
EU9	60	208	83	113,0	23	1,14	8,52	109	2,29
EU10	60	258	91	155,0	19	1,07	3,38	88	0,73
EU11	91	216	66	131,9	19	0,98	9,08	85	1,90
EU12	62	134	60	61,6	18	0,87	3,76	84	0,77
EU13	70	164	53	97,0	17	0,80	3,34	83	0,68
EU14	71	146	51	80,8	22	0,75	3,45	84	0,71
EU15	62	140	63	64,2	13	0,89	9,04	78	1,73
EU16	154	178	34	113,2	22	0,95	4,19	85	0,87
SP1	149	184	58	96,2	20	0,91	5,85	87	1,25
SP2	83	161	43	101,4	28	1,05	5,16	87	1,10
SP3	129	143	43	74,2	21	0,80	19,86	76	3,72
SP4	79	192	59	117,2	24	1,32	6,45	88	1,39
SP5	60	170	57	101	16	0,91	11,09	84	2,29
SP6	79	175	64	95,2	38	0.86	7,45	88	1,60
SP7	163	181	38	110,4	15	1,13	16,25	97	3,84
SP8	190	244	49	157	23	0,95	7,94	88	1,70
SP9	129	268	45	197,2	22	1,17	14,35	91	3,18
SP10	98	182	61	101,4	14	0,72	10,0	85	2,07
OB1	68	174	50	157,4	39	1,24	4,89	115	1,38
OB2	311	212	41	110,4	24	1,11	10,54	95	2,47
OB3	106	167	39	106,8	18	1,05	14,89	83	3,04
OB4	121	182	40	117,8	16	1,01	38,05	85	7,96
OB5	91	202	69	114,8	24	1,10	11,58	85	2,42
OB6	62	185	53	119,6	18	0,96	8,37	88	1,81
OB7	93	174	43	112,4	35	1,13	22,33	119	6,49
OB8	93	196	54	123,4	34	0,85	8,82	94	2,02
OB9	61	134	55	66,8	39	0,95	6,45	89	1,40
OB10	93	167	60	88,4	27	0,88	15,38	98	3,68

Legenda: TG, triglicerídeos; CT, colesterol total.

**Tabela III** – Perfil pressórico da população do estudo.

Amostra	PAS	PAD	PAM
EU1	107,3	61,3	76,6
EU4	100,7	66,0	77,6
EU5	96,7	60,0	72,2
EU6	96,7	60,0	72,2
EU9	107,0	74,3	85,2
EU10	115,7	80,0	91,9
EU11	107,7	68,3	81,2
EU12	102,6	72,0	82,2
EU13	96,7	63,0	74,2
EU14	105,7	63,0	77,2
EU15	109,3	71,0	83,8
EU16	124,3	71,0	88,7
SP1	111,0	77,0	88,3
SP2	140,7	101,7	114,7
SP3	109,3	65,0	79,7
SP4	123,7	80,7	95,0
SP5	103,7	61,3	113,5
SP5	111,0	73,0	85,6
SP7	122,6	82,6	95,9
SP8	128,6	83,3	98,4
SP9	118,0	75,3	89,5
SP10	119,0	79,0	92,3
OB1	120,7	73,3	89,1
OB2	138,7	91,3	107,1
OB3	113,3	76,0	88,4
OB4	118,7	72,3	87,8
OB5	136,0	81,0	99,3
OB6	103,0	78,3	86,5
OB7	117,3	78,0	91,1
OB8	99,6	75,6	83,6
OB9	115,6	73,3	87,4
OB10	107,6	73,6	84,9

**Legenda:** PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PAM, pressão arterial média.

## ANEXO II- Análise da expressão dos miRNAs circulantes por qPCR.

**Figura I- Expressão dos miRNAs por qPCR em todas as amostras.** Perfis de expressão de miR-17-5p vs CC nos gêneros feminino e masculino **(a).** Perfis de expressão miR-103-3p vs vs CC nos gêneros feminino e masculino **(b)** miR-375-3p vs vs CC nos gêneros feminino e masculino., Valores de fold- change expressos em escala log10, p < 0.05.

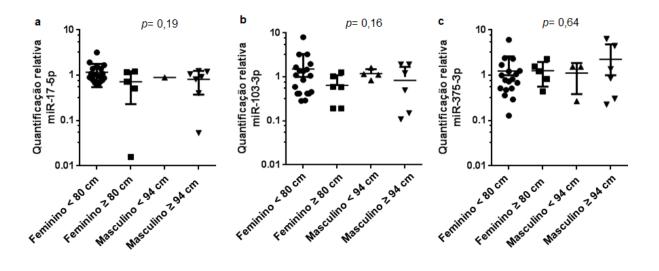


Figura II- Expressão dos miRNAs por qPCR em todas as amostras. Perfis de expressão de miR-17-5p vs colesterol total dentro dos limites de normalidade x acima dos limites de normalidade (a), Perfis de expressão miR-103-3p vs colesterol total dentro dos limites de normalidade x acima dos limites de normalidade (b) miR-375-3p vs colesterol total dentro dos limites de normalidade x acima dos limites de normalidade, Valores de foldchange expressos em escala log10, p < 0.05.

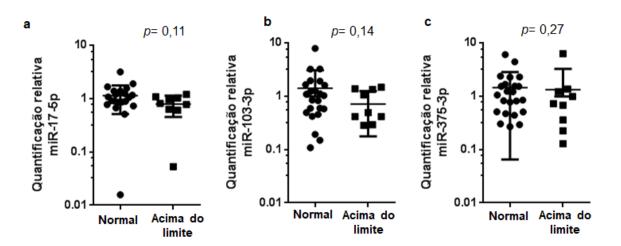


Figura III- Expressão dos miRNAs por qPCR em todas as amostras. Perfis de expressão de miR-17-5p vs HDL dentro da normalidade e acima do limite de normalidade (a). Perfis de expressão miR-103-3p Vs HDL dentro da normalidade e acima do limite de normalidade obeso (b). Perfis de expressão de e miR-375-3p Vs HDL dentro da normalidade e acima do limite de normalidade. Valores de fold- change expressos em escala log10, p < 0,05

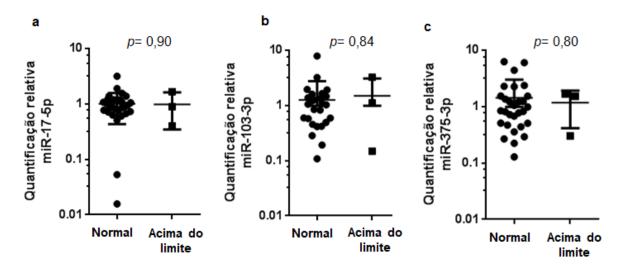


Figura IV- Expressão dos miRNAs por qPCR em todas as amostras. Perfis de expressão de miR-17-5p vs HOMA-IR normal e acima do valor de referência (a), Perfis de expressão miR-103-3p vs HOMA-IR normal e acima do valor de referência (b), Perfis de expressão de e miR-375-3p vs HOMA-IR normal e acima do valor de referência. (c). Valores de fold- change expressos em escala log10, p < 0,05

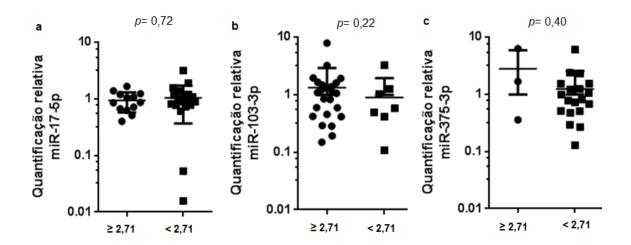
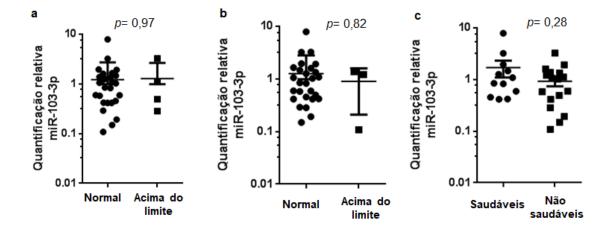


Figura V- Expressão dos miRNAs por qPCR em todas as amostras. Perfis de expressão de miR-103-3p vs triglicerídeos dentro da normalidade e acima da normalidade (a). Perfis de expressão miR-103-3p vs glicose dentro da normalidade e acima da normalidade (b), Perfis de expressão miR-103-3p vs indivíduos saudáveis e não sauáveis (c). Valores de fold- change expressos em escala log10, p < 0,05





## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa:

"Os microRNAs representam um novo paradigma na identificação precoce de complicações cardiometabólicas associadas ao excesso de peso?"

Você foi selecionado por ordem de chegada e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição (Unigranrio). Os objetivos deste estudo são estudar as associações entre as medidas antropométricas, sua massa corporal (peso), pressão sanguínea arterial e a identificação do perfil microRNAs presentes no soro.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em responder a um questionário sobre dados pessoais e de saúde geral, fornecer amostras de sangue, ser pesado e medido (altura e circunferência da cintura e do quadril). Os riscos relacionados com sua participação são mínimos. Os benefícios relacionados com a sua participação um melhor conhecimento da sua saúde geral.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Os resultados de seus exames serão confidencias, ou seja, somente o pesquisador terá acesso a suas informações e serão utilizados somente para o objetivo do presente estudo.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o(a) senhor (a), podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento com os pesquisadores responsáveis com

.

professora Virginia Genelhu ou Cláudia Maria Pereira no telefone 26727776 ou e-mail <u>claudemarie br@unigranrio.edu.br</u> ou com Paulo André da Silva no telefone 26727776 ou e-mail <u>paulo.silva@unigranrio.edu.br</u> ou Karine Coimbra de Oliveira no e-mail <u>karine.coimbra@ymail.com</u>

Pesquisador Responsável
Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.
O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UNIGRANRIO, localizada na Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160 – CEP 25071-202 TELEFONE (21).2672-7733 - ENDEREÇO ELETRÔNICO: cep@unigranrio.com.br
Duque de Caxias, de de 20

,

Sujeito da pesquisa





## PROJETO DE PESQUISA - FICHA DE ANAMNESE

Nome:	Data de Nascimento://						
Endereço:							
Telefone:	Estado civil:	Profissão:					
Questionário socio	demográfico						
Sua cor ou raça é: (	) 1 - Branca ( ) 2 - Preta ( ) 3 - A	Amarela ( ) 4 - Parda ( )5 - Indígena					
	: ( ) 1. Menor de 1 salário mínimo ? a 3 salários mínimos ( ) 5. mais o	o ( ) 2. de 1 salário mínimo ( ) 3. de 1 a 2 salário de 3 salários mínimos					
Nível de escolaridad	de: Sabe ler e escrever? ( ) Sim	( ) Não					
Qual é o curso mais e	levado que cursou, no qual concl	luiu pelo menos uma série?					
	Questionário Médico						
1. Nome do seu méd	dico:	Telefone:					
2. Data do último ex	ame médico:						
3- Você já foi hosp	italizado? ( )sim ( ) não (	) não sei					
4- Em caso de resp	oosta positiva, qual o motivo?						
5- Você está sob c	uidados médicos? ( )sim ( ) r	não ( ) não sei					
6- Em caso de resp	oosta positiva, qual o motivo?						
7- Você tem ou já t	eve alguma das seguintes condiç	cões:					
8- Doenças congêr	nitas do coração? ( )sim ( )	não ( ) não sei					
9- Doenças cardía	cas (ex.: infarto, angina, derrame,	pressão alta, pressão baixa?).					
( )sim ( ) não	( ) não sei						
10- Respiração difí	cil quando deitado ou sem fazer e	esforço? ( )sim ( ) não ( ) não sei					
11- Inchaço nos pé	s ou tornozelos? ( )sim (	) não ( ) não sei					
12- Dor, pressão o	u mal estar no peito? ( )sim (	) não ( ) não sei					
13-Febre reumática	a? ( )sim ( )não ( )não	sei					

Observações :	
Assinatura	Data
Exame Físico	
Pressão Arterial	
1ª medida : PAS	PAD
2ª medida : PAS	PAD
3ª medida : PAS	PAD
Peso:	
Altura:	
IMC:	
( ) Eutrófico ( ) Sobrepeso ( ) Obeso I ( )	Obeso II ( ) Obeso III
Circunferência de Cintura:	
Circunferencia de Quadril:	
Relação Cintura – Quadril :	

# **ANEXO V–** COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA UNIGRANRIO/ CEP UNIGRANRIO

## UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO PROFESSOR JOSÉ DE SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Titulo da Pesquisa: OBESIDADE ¿ UMA ABORDAGEM TRANSLACIONAL: Os microRNAs representam

um novo paradigma na identificação precoce de complicações cardiometabólicas

associadas ao excesso de peso?

Pesquisador: Virginia Genethu de Abreu Francischetti

Área Temática: Versão: 1

CAAE: 51206315.1.0000.5283

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE UNIGRANRIO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1,359,083

## Apresentação do Projeto:

Projeto muito bem elaborado, de leitura extremamente clara, mostrando grande domínio sobre o tema relevante e atual que vem se tomándo um grave problema da saúde pública, que nos últimos anos tem atingido niveis epidêmicos. Deve-se enfatizar ainda que a proposta é bastante inovadora em nosso meio, pois trata-se da aplicação dos modemos métodos da biologia molecular tendo como base um referencial taórico extremamente atualizado.

## Objetivo da Pesquisa:

O objetivo básico deste projeto é estudar os possíveis mecanismos regulatórios exercidos por microRNAs (miRNAs) no processo inflamatório crônico e subclínico desenvolvidos em individuos classificados como portadores de sobrepeso e obesidade. Além disso pretende-se estudar as suas interações com outros biomarcadores associados a diversas co-morbidades como a Hipertensão anterial, diabetes melitos tipo, doenças cardio-vasculares e cáncer, individuos com peso normal/grupo controle (GC), portadores do sobrepeso (SP) e de obesidade (OB). Para tal o estudo será realizado em três grupos de individuos, de acordo com o Índice de Massa Corporal (Eutróficos, Sobrepeso e Obesos), com idades na faixa de 28 a 30 anos de idade.

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160

Baimo: 25 de Agosto CEP: 25.071-202

UF: RJ Municipie: DUQUE DE CAXIAS

Telefone: (21)2672-7733 Fax: (21)2672-7733 E-mail: cep@unigranto.com.br

Plicing Of de IIS

## UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO PROFESSOR JOSÉ DE SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 1.569.665

#### Avaliação dos Riscos e Beneficios:

Uma vez que não será faito nenhum tipo de intervenção terapéutica nem nutricional, exceto o pequeno desconforto normal pala extração de uma pequena quantidade de sangue periférico, não existem algum tipo risco. Os beneficios são de grande importância para o desenvolvimento da pesquisa básico e possível aplicação (Medicina personalizada).

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Como mencionado antes, considero a proposta de suma importância, pela sua atualidade, inovação, seu alcance social, e sua contribuição para a formação de recursos humanos para a pesquisa.

## Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Projeto muito bem apresentado, coordenado por pesquisadora de grande experiência e de reconhecida qualificação científica, o que permite ter a certeza do sucesso no desenvolvimento do mesmo e o alcanos das metas propostas.

## Recomendações:

Nenhuma

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sou de parecer que esta proposta seja aprovada sem restrições.

## Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador (a),

O Comité de Etica em Pesquisa da UNIGRANRIO atendendo o previsto na Resolução 468/12 do CNS/MS APROVOU o referido projeto na reunião ocorrida em 09 de dezembro de 2015. Caso o (a) pesquisador (a) aftere a pesquisa é nocessário que o projeto retorne ao Sistema Plataforma Brasil para uma futura avallação e emissão de novo perecer. Lembramos que o (a) pesquisador (a) deverá encaminhar o relatório da pesquisa após a sua conclusão, como um compromisso junto a esta instituição e o Sistema Plataforma Brasil.

Cordialmente,

CEP/Unigrannio.

Enderego: Rua Prof. José de Bouza Herdy, 1160

Bairro: 25 de Agosto CEP: 25.071-202

UP: RJ Municipie: DUQUE DE CAXIAS

Telefone: (21)2672-7733 Fax: (21)2672-7733 E-mail: cap@unigranic.com.br

PROPERTY NO. CO.

# UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO PROFESSOR JOSÉ DE SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 1.359.083

## Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO 631059.pdf	23/11/2015 15:38:05		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	23/11/2015 15:33:04	Virginia Genelhu de Abreu Francischetti	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	23/11/2015 15:26:01	Virginia Genelhu de Abreu Francischetti	Aceito
Outros	CEP_Termo_de_Confidencialidade.pdf	23/11/2015 15:11:48	Virginia Genelhu de Abreu Francischetti	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	23/11/2015 15:05:19	Virginia Genelhu de Abreu Francischetti	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao.pdf	23/11/2015 15:03:47	Virginia Genelhu de Abreu Francischetti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	23/11/2015 14:59:12	Virginia Genelhu de Abreu Francischetti	Aceito
Brochura Pesquisa	6039050286853283.pdf	23/11/2015 14:53:37	Virginia Genelhu de Abreu Francischetti	Aceito
Folha de Rosto	CCF23112015_0001.pdf	23/11/2015 14:18:15	Virginia Genelhu de Abreu Francischetti	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Assinado por:

Renato Cerqueira Zambrotti (Coordenador)

DUQUE DE CAXIAS, 09 de Dezembro de 2015

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160

Bairro: 25 de Agosto UF: RJ M CEP: 25.071-202

Município: DUQUE DE CAXIAS

Telefone: (21)2672-7733 Fax: (21)2672-7733 E-mail: cep@unigranrio.com.br



Duque de Caxias, 03 de dezembro de 2019

Do: Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO

Para: Prof<sup>a</sup>, Dr<sup>a</sup>, Virginia Genelhu de Abreu, Prof. Dr. Emílio Antônio Francischetti e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Maria Pereira (Responsáveis pela Pesquisa)

O Comité de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO, após avaliação ética do Protocolo de Pesquisa registrado na Plataforma Brasil sob o número CAAE 51206315.1.0000.5283, referente à pesquisa intitulada "OBESIDADE- UMA ABORDAGEM TRANSLACIONAL OS MIRNAS REPRESENTAM UM NOVO PARADIGMA NA IDENTIFICAÇÃO PRECOCE DE COMPLICAÇÕES CARDIOMETABÓLICAS ASSOCIADAS AO EXCESSO DE PESO? ", concluiu pela sua APROVAÇÃO após análises e avaliações dos documentos inseridos na Plataforma Brasil apresentarem coerência de acordo com as diretrizes legais e normativas do Sistema CEP/CONEP, destacando-se a Resolução CNS nº 466/2012, a Norma Operacional CNS nº 001/2013, a Resolução CNS nº 510/2016 e outros documentos regulatórios referentes ao controle social das pesquisas envolvendo seres humanos.

O Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO reitera a orientação da CONEP de que o CEP deverá ser informado sobre qualsquer incidentes ocorridos no decorrer da pesquisa e que, ao término da mesma, conforme cronograma apresentado no projeto de pesquisa, seja encaminhado ao Comitê resumo descritivo sobre os resultados obtidos, a fim ser expedido o certificado de conclusão da pesquisa.

Por. Renato C. Zambrotti

Coordenador do CEP-UNIGRANRIO

Danubia de S. Rangel da Silva Assistente Adm. CEP-UNIGRANRIO

CEP/UNIGRANRIO - COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA da UNIGRANRIO Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160 - 25 de Agosto - Duque de Caxias - CEP; 25071-202 Tel.: 21 2672-7733 - E-mail: <a href="mailto:cep@unigranrio.com.br">cep@unigranrio.com.br</a>