**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**

**Relação da expressão do hsa-mir-150 e do gene FTO com
sobrepeso/obesidade, perfil lipídico e glicemia**

Vitor Nolasco de Moraes

**Ribeirão Preto
2018**

Vitor Nolasco de Moraes

**Relação da expressão do hsa-mir-150 e do gene FTO com
sobrepeso/obesidade, perfil lipídico e glicemia**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de mestre em
ciências.**

Área de concentração: Investigação biomédica.

**Ribeirão Preto
2018**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

De Moraes, Vitor Nolasco

**Relação da expressão do hsa-mir-150 e do gene FTO com
sobrepeso/obesidade, perfil lipídico e glicemia**

69f.:il.; 30cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Investigação biomédica

Orientador: Bueno Jr, Carlos R.

1. Obesidade. 2. Mir-150. 3. FTO. 4. Tecido adiposo

FOLHA DE APROVAÇÃO

VITOR NOLASCO DE MORAES

Relação da expressão do hsa-mir-150 e do gene FTO com sobrepeso/obesidade, perfil lipídico e glicemia

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em ciências.

Área de concentração: Investigação biomédica.

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

“Eu sei que não sou nada e que talvez nunca tenha tudo. Aparte isso, eu tenho em mim todos os sonhos do mundo”.

(Fernando Pessoa)

Dedico este trabalho aos meus pais, familiares, amigos e a todos os professores que tive. Vocês foram fundamentais para conclusão deste trabalho.

Dedico também este trabalho a mim. Por ter sido forte e ter conseguido chegar até aqui, superando as adversidades de anos morando longe de casa, as noites de solidão e busca árdua pelo conhecimento.

“Sentimos saudade de certos momentos da nossa vida e de certos momentos de pessoas que passaram por ela”.

Carlos Drummond de Andrade

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais que em todos os momentos da minha vida não mediram esforços para minha educação e formação como pessoa. Pelo amor incondicional que me proporcionaram e por serem os pilares que me deram suporte quando tudo parecia desmoronar. Tenho total reconhecimento e admiração por tudo que fizeram, pois são os maiores responsáveis por eu ter conseguido chegar até aqui. Também agradeço a todos meus familiares por contribuírem comigo.

Agradeço a todos os professores que contribuíram para minha formação e que conseguisse cumprir mais essa etapa. Em especial agradeço ao meu orientador, professor Carlos Roberto Bueno Jr. Que por sua perseverança como educador e cientista me fizeram com que muitas vezes me espelhasse nele, por sempre ter me dado confiança e acreditado em mim durante esses cinco anos em seu laboratório e pelas vezes na qual agiu como muito mais que um orientador. E meu coorientador André Lima Queiroz pela paciência em me ensinar e sempre me incentivar durante a realização deste projeto.

Agradeço a todos os meus amigos que fazem com que toda minha trajetória de vida seja mais prazerosa. Também as pessoas que tive o imenso prazer de conhecer durante a vida, as quais sempre me deixaram aprendizados que nunca esquecerei.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, em especial Jhennyfer, Thiago e Karine pela oportunidade de trabalhar com vocês, e gostaria de dizer que sem vocês não teria conseguido concluir esse trabalho.

Agradeço à técnica do laboratório, Simone, pelas conversas filosóficas e por ter me ensinado muita coisa dentro do laboratório.

Agradeço aos laboratórios que me ajudaram e em especial aos laboratórios das professoras Carla Nonino e Luciana Alberici, os quais estiveram de portas abertas para me ensinar e/ou realização de experimentos.

À coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

Agradeço as dificuldades que surgiram no desenvolvimento desse projeto, pois me tornaram mais forte.

Por fim, gostaria de dizer os meus mais sinceros obrigados a todos!

MORAES, V. N. Relação da expressão do hsa-mir-150 e do gene FTO com sobrepeso/obesidade, perfil lipídico e glicemia. Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2018.

Introdução: O número de indivíduos com sobrepeso e obesidade está aumentando, e a busca por entender mecanismo relacionados a esta doença se mostram cada vez mais importantes. O gene FTO foi o primeiro gene associado à obesidade, mas não se sabe muito a respeito de como é regulado e suas vias. MiRs são pequenos RNAs regulatórios que podem estar associados à obesidade, como também na regulação do gene FTO. Dessa forma, pretendemos identificar a relação do gene FTO e do hsa-mir-150 com sobrepeso/obesidade, perfil lipídico e glicemia de jejum. **Métodos:** Homens e mulheres (18 anos ou mais), com IMC > 25 kg/m² participaram do presente estudo e foram analisadas a expressão do gene FTO, expressão do mir-150, parâmetros bioquímicos do sangue e antropometria. **Resultados:** Observamos a expressão do gene FTO estar relacionada à obesidade, LDL e glicemia de jejum. **Conclusão:** O gene FTO parece de fato estar relacionado à obesidade, LDL e glicemia de jejum, diferentemente do mir-150.

Palavras chave: Obesidade, Mir-150, FTO, Tecido adiposo

MORAES, V. N. Relationship between the hsa-mir-150 and FTO gene expression with overweight/obesity, lipid profile and glycemia. Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2018.

Introduction: The overweight population is growing in the entire world, and the search for obesity-associated mechanisms is important for a better understanding of this disease. The FTO gene was the first obesity associated gene. Otherwise, its pathways and how it can be regulated remain unknown. MiRs are small no coding RNAs that may be associated to obesity and FTO gene regulation. Thus, the aim of this study was to verify the relationship among the FTO gene and the mir-150 expression with overweight/obesity lipid profile and fast blood glucose. Methods: Men and woman (18 years older or above), with body mass index > 25 Kg/m², were enrolled in the present work and the FTO gene and mir-150 expression, biochemical parameters of blood and anthropometric measure were analyzed. Results: The results highlight that the FTO gene expression is associated to obesity, LDL and fasting blood glucose. Conclusion: Indeed, the FTO gene seems to be related to obesity, LDL and blood fasting glucose, differently of the mir-150.

Keywords: Obesity, Mir-150, FTO, Adipose tissue

Lista de abreviaturas

AgRP	Proteína relacionada à Agouti
AIKB	Dioxigenase dependente de α-cetoglutarato
AVE	Acidente vascular encefálico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CaMKII	Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina
CREB	Elemento de resposta a cAMP
E. Coli	Escherichia coli
FTO	Gene associado à massa gorda e obesidade
GWAS	Estudos de associação genômica ampla
hΔG	Energia livre de hibridização
IMC	Índice de massa corporal
KSRP	Proteína reguladora de splicing tipo KH
MC4R	Receptor de melanocortina 4
μl	Microlitros
MiRNA	Micro RNA
MiRs	MicroRNAs
mTORC1	Complexo 1 da proteína alvo mecanístico da rapamicina
NF-κB	Fator nuclear kappa B
ng	Nanogramas
nM	Nano molar

NPY	Neuropeptídio Y
O₂	Molécula de oxigênio
P72	Prolina codificada pelo códon 72
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGC1-α	Receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissoma coativador 1-alfa
Pré-miRNA	Micro RNA precursor
Pri-miRNA	Micro RNA primário
PYY3-36	Peptídeo YY
R72	Arginina codificada pelo códon 72
RAN	Ran-GTPase
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNAPII	RNA polimerase II
RPL	Proteína ribossomal L39
RPM	Rotações por minuto
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
Sp	Sobrepeso
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
UTR	Região não traduzida
XPO5	Exportina-5 (XPO5)

Sumário

1. Introdução	15
1.1.Obesidade	15
1.2.FTO gene e proteína	19
1.3.MicroRNA	22
2. Objetivo	25
3. Material e métodos	26
3.1.Participantes	26
3.2.Análises	26
3.3.Biópsia	27
3.4.Extração de RNA	27
3.5.Síntese de cDNA a partir de mRNA	28
3.6.Análise da expressão de mRNA	28
3.7.Análise bioinformática	29
3.8.Síntese de cDNA a partir de miRNA	29
3.9.Análise da expressão de miRNA	30
3.10.Análise estatística	30
4. Resultados	32
4.1.Análise bioinformática	32
4.2.Diferenças entre as variáveis antropométricas nos grupos	33
4.3.Correlações com obesidade, perfil lipídico e glicemia	33
4.4 Regressões com IMC, LDL e glicemia	36
4.5.Expressão de mRNA entre os grupos	37
4.6.Expressão de miRNA entre os grupos	38
4.7.Regressão entre miRNA e mRNA	39
5. Discussão	40
6. Conclusão	44
7. Referências	45
8. Apêndices	55
8.1. Apêndice A – gel de integridade	55
8.2. Apêndice B – Lista de miRs	56
8.3.Apêndice C – Valores da PCR RPL 39	60
8.4.Apêndice D – Curva de melting FTO	61
8.5.Apêndice E – Curva de melting RPL 39	62
8.6.Apêndice F – Valores da PCR mir-103	63

8.7.Apêndice G – Produções durante o mestrado.....	64
--	----

Introdução

1. Introdução

1.1. Obesidade

Há vários anos vem ocorrendo uma mudança na nutrição de populações de vários países em todo o mundo, mudança que ocorre em direção aos alimentos gordurosos, ricos em açúcares e industrializados. Juntamente com a nutrição, os hábitos da prática de exercícios físicos mudam, tendo o número de praticantes reduzido (Francischi *et al.*, 2000). No Brasil, a mudança no estilo de vida não é diferente da direção tomada no restante do mundo, tendo também aumentado o consumo de alimentos com alto índice calórico, com poucas fibras, ricos em gorduras trans e saturadas, e açúcares, juntamente com a inatividade física, tabagismo e consumo exacerbado de álcool, contribuindo assim para o aumento da gordura corporal, sobrepeso e obesidade (Azevedo *et al.*, 2014).

Sobrepeso e obesidade são definidos como um estado no qual ocorre um aumento significativo na massa corporal, de modo que seja prejudicial à saúde (Friedman, 2000). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica sobrepeso e obesidade pelo IMC (massa corporal em Kg / altura em m²) (Tabela 1). E assim como o aumento de hábitos de vida considerados não saudáveis, a obesidade também cresce em todo o mundo, havendo mais de 1.9 bilhão de adultos com sobrepeso e destes adultos, mais de 650 milhões eram obesos. Entre menores de 5 anos a estimativa é de que 41 milhões possuam sobrepeso ou obesidade e entre crianças e adolescentes de 5 a 19 anos a estimativa é de mais de 340 milhões com sobrepeso e obesidade (Oms, 2016). O crescimento da obesidade não é diferente no Brasil, tendo aumentando cerca de 60% entre 2006 e 2016, na população residente nas capitais brasileiras (Brasil, 2016).

Tabela 1: Classificação de sobrepeso e obesidade

Idade	Classificação
Adultos	<p>Sobrepeso: $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$</p> <p>Obesidade: $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$</p>
Crianças até 5 anos	<p>Sobrepeso: IMC maior que dois desvios padrão acima da curva de crescimento da OMS para crianças</p> <p>Obesidade: IMC maior que três desvios padrão acima da curva de crescimento da OMS para crianças</p>
Crianças/adolescentes entre 5 e 19 anos	<p>Sobrepeso: IMC maior que um desvio padrão acima da curva de crescimento da OMS</p> <p>Obesidade: IMC maior que dois desvios padrão acima da curva de crescimento da OMS</p>

Curvas de crescimento para crianças até 5 anos podem ser acessadas por meio de: http://www.who.int/childgrowth/standards/weight_for_height/en/ e curvas de crescimento para crianças e adolescentes entre 5 a 19 anos podem ser acessadas por meio de http://www.who.int/growthref/who2007_bmi_for_age/en/

O acúmulo de gordura corporal resultando na obesidade é um processo decorrente do balanço entre a ingestão energética (consumo de alimentos), por meio da via de controle de fome e saciedade (Figura 1) e gasto energético

(metabolismo/exercício) (Schwartz e Morton, 2002; Lizarbe *et al.*, 2013). No entanto, por trás do processo da obesidade outros fatores estão envolvidos, como genéticos, culturais e psicológicos (Kopelman, 2000).

Figura 1: Controle de fome e saciedade no hipotálamo - Leptina e insulina secretadas por tecidos periféricos atuam no hipotálamo, diminuindo o apetite. Elas atuam inibindo os neurônios orexígenos NPY/AgRP e estimulando os neurônios de melanocortina, reduzindo o apetite. PYY₃₋₃₆ parece também exercer papel na regulação do apetite. Por outro lado, a grelina atua estimulando a fome por meio de ativação dos neurônios NPY/AgRP. Retirado de (Schwartz e Morton, 2002).

A influência da genética na obesidade tem se mostrado um fator cada vez mais importante com o avanço tecnológico, e é atribuído que algo em torno de 40 a 70% da variação individual do IMC seja devido a fatores genéticos. Decorrente dos avanços tecnológicos, estudos de associação genômica ampla (GWAS) foram capazes de identificar 97 loci gênicos associados com IMC (Locke *et al.*, 2015). Apesar de conhecida importância, não se tem amplo

conhecimento por quais mecanismos os fatores genéticos influenciam na obesidade. No entanto, pode-se citar estudos associando variações genéticas com a obesidade. Kung *et al.* (2016), estudando o SNP (polimorfismo de nucleotídeo único) rs1042522 do gene p53 em camundongos, conhecido como supressor tumoral, que codifica para prolina (P72) ou arginina (R72), demonstraram que o animal que codificava para R72 desenvolvia obesidade grave e intolerância à glicose quando alimentado com dieta hipercalórica comparado ao que codificava para P72. Corella *et al.* (2012), estudando os polimorfismos rs9939609 do gene FTO e rs17782313 do gene MC4R, demonstraram que o efeito aditivo dos alelos de risco apresentava maior risco de obesidade.

O fator cultural que está diretamente relacionado com os hábitos e preferências de vida diária também apresenta importante relação com a obesidade. Por exemplo, indivíduos com a mesma etnia apresentam perfil antropométrico diferente - índios Pima vivendo no México apresentavam menor IMC do que os que viviam nos Estados Unidos (Ravussin, 1995). Acesso à informação sobre como identificar os riscos da obesidade (Pakpour *et al.*, 2011), tempo gasto vendo televisão e o maior consumo de alimentos considerados não saudáveis (Rossi *et al.*, 2010), por exemplo, também estão sendo associados à obesidade.

O aspecto psicológico parece ser um dos fatores mais marcantes por trás dessa doença para alguns autores (Segal *et al.*, 2002; Wanderley e Ferreira, 2010). Isso devido a esse fator estar associado com a aceitação da sociedade com relação à imagem do sujeito, uma vez que hoje em dia são impostos padrão de beleza, saúde, desportivos e eróticos dificilmente atingíveis por um indivíduo, podendo levar a agravar a força do fator psicológico. Com relação aos aspectos psicológicos, pode-se citar autoimagem, transtornos alimentares, ansiedade e depressão, entre outros.

A obesidade é uma doença de múltiplos fatores e leva a diversas alterações fisiológicas. Estas alterações estão relacionadas aos locais em que o excesso de tecido adiposo está distribuído no corpo. De modo geral, pode se citar algumas alterações decorrentes da obesidade, como volume total de sangue, função cardíaca, função respiratória, nível e resistência à insulina, entre outros (Kopelman, 2000). Estas alterações, por sua vez, resultam em doenças

associadas à obesidade, como doenças cardiovasculares, AVE, hipertensão, diabetes tipo II, dislipidemia, osteoartrite e alguns tipos de cânceres (Must *et al.*, 1999). A obesidade e doenças relacionadas, anteriormente citadas, representam um grande custo para o governo e estima-se que se tenha um gasto de mais de 2,1 bilhões de reais somente no sistema de saúde pública no Brasil (Rech *et al.*, 2016). Dessa forma, sendo uma doença de grande complexidade, a obesidade apresenta um grande potencial para estudos moleculares de mecanismos que regulam a massa corporal, o que poderia acelerar a descoberta de novos tratamentos.

1.2. FTO: gene e proteína

Estudos de associação genômica ampla foram responsáveis por descobrir aproximadamente 2000 loci gênicos associados a diversas condições e doenças, sendo o FTO (gene associado à massa gorda e obesidade), localizado no cromossomo 16q12.2, o primeiro gene associado à obesidade, tendo o locus desse gene a maior associação com o IMC e risco de obesidade (Loos e Yeo, 2014), com grande reprodutibilidade (Frayling *et al.*, 2007; Scuteri *et al.*, 2007).

SNPs no íntron um do gene FTO têm sido associados com IMC e predisposição a diabetes tipo II (Frayling *et al.*, 2007; Scuteri *et al.*, 2007; Legry *et al.*, 2009). Com estudos controversos de como polimorfismos no gene FTO afetam o nível de expressão de mRNA (Wåhlén *et al.*, 2008; Berulava e Horsthemke, 2010), não encontramos nenhum estudo na literatura do efeito dos polimorfismos com a expressão da proteína FTO. No entanto, atribui-se polimorfismos nesse gene atuando no controle da ingestão alimentar (Speakman *et al.*, 2008) e que o gene atue nesse controle independente do nível de expressão da proteína (Gao *et al.*, 2010). Estudos com camundongos super expressando o gene FTO (Church *et al.*, 2010) apresentavam aumento da massa corporal e massa gorda independente da alimentação, e a inativação do gene FTO (Fischer *et al.*, 2009) levava a retardo no desenvolvimento, redução no tecido adiposo e na massa magra, sendo resultante do gasto energético e ativação simpática aumentados.

FTO é uma proteína de localização nuclear, pertence à família das proteínas AlkB dioxigenase dependente de α -cetoglutarato, possuindo uma

capacidade de demetilase de 3 metil timina e 3 metil uracil dependente de Fe(II) e 2-oxoglutarato em DNA fita simples (Figura 2), com grande similaridade à AlkB bacteriana (Gerken *et al.*, 2007). Ela também apresenta capacidade de demetilase em RNA – N6 metil adenosina (m6A), sendo o maior substrato de FTO (Jia *et al.*, 2011).

Figura 2: Reparo no DNA por meio da capacidade de demetilase da proteína AlkB de E. Coli – oxidação de 1-metil adenina e 3—metil citosina dependente de O_2 , α -cetoglutarato e Fe(II) e gerando CO_2 e succinato. Grupamento metil são retirados em forma de formaldeído, resultando no reparo do nucleotídeo. Retirado de (Trewick *et al.*, 2002).

Não se tem muitas informações de como FTO atua, como também sua via metabólica. No entanto, alguns estudos sugerem mecanismos de regulação - (Cheung *et al.*, 2013; Gulati *et al.*, 2013) demonstraram FTO como sendo um sensor de aminoácidos (A.A), o qual apresenta alta taxa de degradação quando a célula está desprovida de A.A. A partir daí, (Gulati *et al.*, 2013) propuseram que o complexo 1 da proteína alvo mecanístico da rapamicina (mTORC1), conhecida por estar relacionada à disponibilidade de A.A, poderia estar relacionada a FTO. Dessa forma, demonstrou-se em células (fibroblastos embrionários) de camundongos FTO -/- ativação diminuída da via da mTORC1. Assim, baixa disponibilidade de A.A regularia negativamente FTO, tornando a célula menos sensível a A.A, que responderia reduzindo a atividade da via de

sinalização de mTORC1, aumentando a autofagia para manter os níveis celulares de energia, o que talvez explicaria atraso de desenvolvimento e fenótipo magro, como apresentado por Fischer *et al.* (2009) (Figura 3).

Figura 3: FTO como sensor de A.A – a) quando há disponibilidade de A.A para a célula, FTO e via da mTORC1 estão em níveis adequados de expressão, levando à tradução e crescimento celular adequados e diminuição de autofagia; **b)** baixa disponibilidade de A.A leva à inibição de FTO e mTORC1, diminuindo tradução e crescimento celular e aumento de autofagia; **c)** deficiência de FTO leva a célula a não detectar A.A, reduzindo mTORC1, levando à autofagia. Retirado de (Fischer *et al.*, 2009).

Além de estar relacionado a obesidade, FTO parece estar relacionado a outras doenças - Ding *et al.* (2018), estudando insuficiência prematura do ovário, demonstraram esta condição estar relacionada ao nível aumentado de m6A no RNA e que isso seria devido à menor expressão do gene e da proteína FTO. Chen *et al.* (2018) demonstraram associação de polimorfismos no gene FTO com degeneração do disco intervertebral, assim como podendo ser indicativo de começo da doença na população Chinesa Han. Além disso, sugeriram o alelo T do polimorfismo rs1121980 como um marcador independente da doença, Assim como também com diversos tipos de cânceres – gástrico, de mama, tireoide, endometrial e pulmão (Tan *et al.*, 2015; Sigurdson *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018). O gene FTO parece desempenhar função importante na célula e estar relacionado a diversas doenças, mostrando ser um

alvo importante para estudos moleculares. Dessa forma, além da sua suposta importância para a célula, com finita informação a respeito de suas vias de regulação, há uma quantidade escassa de estudos avaliando a expressão do gene FTO em humanos e sua relação com obesidade (apresentados posteriormente na discussão).

1.3. microRNAs

Diversas pesquisas têm sido realizadas estudando o gene FTO. No entanto, pouco se sabe como esse gene é regulado e se microRNAs (miRs) poderiam estar envolvidos na regulação desse gene. O primeiro miR foi inicialmente descoberto em 1993 por Lee *et al.* (1993). O estudo apresentou a descoberta de um gene (lin-4) que transcrevia para RNA, não traduzia para proteína e que o transcrito apresentava complementaridade anti senso com a extremidade 3' UTR no gene lin-14. Foi demonstrado também que os produtos do gene lin-4 regulavam a expressão de proteína do gene lin-14, mas não interferiam na quantidade expressa de mRNA, dessa forma apresentando a primeira evidência de regulação por um miRNA, fato que só foi considerado anos mais tarde (Bartel, 2004).

O microRNA (miRNA) é uma pequena molécula fita simples de RNA, com comprimento de aproximadamente 22 nucleotídeos, que atua na regulação pós-transcricional, regulando a expressão de mRNA (RNA mensageiro) e prevenindo a tradução da proteína (Macfarlane e Murphy, 2010). O processamento de miRNA é feito a partir de um longo transcrito primário de miRNA (pri-miRNA) gerado pela RNA polimerase II (RNAPII), que é processado no núcleo pela RNase III Drosha, gerando o miRNA precursor (pré-miRNA), que por sua vez é transportado para o citoplasma pela exportina-5 (XPO5) e RAn-GTPase (RAN). No citoplasma, o pré-miRNA é processado pela RNase III e Dicer, gerando um dsRNA de 21-pb, que se liga ao complexo RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA), que é responsável por selecionar uma das fitas do miRNA maduro (fita driver). O miRNA maduro irá funcionar como guia até o mRNA alvo para que RISC atue impedindo a tradução para proteína (Figura 4). O pareamento do miRNA e do mRNA ocorre na região 3' UTR do mRNA e a eficiência do pareamento é dada por uma região de alta complementaridade,

conhecida como região *seed* no miRNA, que compreende do nt 2 até o 8 da extremidade 5' (Krol *et al.*, 2010).

Figura 4: biogênese de miRNA – 1) transcrição do pri-miRNA pela RNAPII; **2)** o complexo Drosha-DGCR8 processa o pri-miRNA em pré-miRNA, transcrito de aproximadamente 70 nt com estrutura de grampo; **3)** transporte do pré-miRNA do núcleo para o citoplasma pela XPO5 e RAN; **4)** processamento do pré-miRNA pela Dicer, gerando um dsRNA de aproximadamente 20nt; **5)** formação do complexo entre miRNA e RISC; **6)** miRNA servirá como guia para direcionar o complexo RISC ao mRNA alvo, que por sua vez irá reprimir a tradução ou degradar o mRNA. Retirado de (Strubberg e Madison, 2017).

Dentre uma das formas de determinar a interação entre mRNA e miRNA, a utilização de ferramentas *in silico* é uma delas. Existem várias ferramentas para predição da hibridização entre as duas moléculas, e cada ferramenta utiliza

algoritmos baseados em diferentes parâmetros, como por exemplo *TargetScan*, *PicTar* e *Target Rank* que utilizam como parâmetro complementariedade de sequência com ênfase no pareamento de base na região *seed* e conservação da sequência; *RNA Hybrid* e *StarMir* são baseados em estrutura secundária do mRNA e na energia de hibridização com o miRNA; *Tarbase* que leva em consideração informações da literatura sobre a validação da interação mRNA : miRNA, entre outras ferramentas disponíveis (Betel *et al.*, 2008). Apesar de haver muitas ferramentas disponíveis, não é uma tarefa simples determinar a interação entre essas duas moléculas, visto que vários fatores podem influenciar essa interação. No entanto, essa abordagem se mostra uma etapa importante na validação da regulação por miRs (Brodersen e Voinnet, 2009).

MiRs são moléculas conservadas entre espécies, o que sugere que desempenhem função importante na fisiologia do organismo, participando de processos cruciais, como por exemplo desenvolvimento embrionário, diferenciação celular, regulação do ciclo celular, apoptose, entre outros (Macfarlane e Murphy, 2010; Palmero *et al.*, 2011). É importante destacar estudos mostrando o papel de miRs em doenças, sendo a área da oncologia a que apresenta maior número de evidências. Dentre essas estas doenças podemos destacar doenças no miocárdio, Alzheimer, Huntington, câncer gástrico, leucemia, de mama, entre outras doenças (Calin *et al.*, 2007; Frankel *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2008; Thum *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Kheir *et al.*, 2011). Uma vez relacionados a diversos processos biológicos e a doenças, são tentadas terapias relacionadas a miRs, como por exemplo reposição de miRs para tratamento e também utilização como biomarcadores para diagnóstico de doenças (Chen *et al.*, 2008; Trang *et al.*, 2011). Dessa forma, nossa hipótese foi que o gene FTO e miRs estejam relacionados à obesidade, que apresentem expressão alterada dependente do perfil metabólico e que FTO seja regulado por miRs.

Objetivo

2. Objetivos

- 1)** Verificar relação do nível de expressão do gene FTO e do miRNA hsa-150-5p com variáveis da obesidade: IMC, porcentagem de gordura, circunferência da cintura, glicemia de jejum, HDL-colesterol, triglicérides, colesterol e LDL-colesterol.
- 2)** Comparar o nível de expressão do gene FTO e do miRNA hsa-150-5p em indivíduos magros e com sobrepeso ou obesidade.
- 3)** Relacionar o nível de expressão do gene FTO com a expressão do miRNA hsa-150-5p.

Materiais e

Métodos

3. Materiais e métodos

3.1. Participantes

Homens e mulheres (18 anos ou mais) com sobrepeso ou obesidade ($n = 16$), interessados no programa de treinamento físico aeróbio intervalado de alta intensidade, foram convidados a participar do presente estudo. Além disso, uma amostra controle ($n = 5$) composta por homens e mulheres (18 anos ou mais) eutróficos, também foi convidada a participar do estudo. Após o detalhamento de todos os procedimentos e esclarecimento de dúvidas, os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética da Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto da USP (CAAE 37573114.6.0000.5659) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP (CAAE 37573114.6.3001.5440).

3.2. Análises

Os participantes foram submetidos às análises descritas a seguir anteriormente a iniciarem no programa de treinamento acima mencionado. Foram avaliados os seguintes parâmetros: massa corporal e estatura utilizando uma balança (graduação de 50g) com estadiômetro (precisão de 1 mm) (Welmy W200ALCD), circunferência da cintura (altura do umbigo) e do quadril, e porcentagem de gordura corporal, que foi medida por bioimpedância (Maltron BF-906). Antes do exame os participantes do estudo receberam as seguintes informações: não consumir álcool dentro das 24h que antecederam o teste; não realizar exercício físico nem consumir cafeína nas quatro horas que antecederam o teste; e consumir de dois a quatro copos de água dentro das duas horas que antecederam o teste (De Lima Augustemak *et al.*, 2008). Também foi avaliado glicose de jejum, colesterol total e níveis de HDL e LDL (as dosagens bioquímicas foram realizadas por meio da coleta de sangue venoso em jejum de 12 horas por procedimentos padronizados) (Silva *et al.*, 2007). Além das variáveis antropométricas e bioquímicas também foi aplicado o *International*

Physical Activity Questionnaire (IPAQ) (entrevista que avalia a frequência, em dias, e a duração, em minutos, das atividades realizadas por mais de dez minutos contínuos durante uma semana normal, classificadas em vigorosas, moderadas e caminhada) (Silva *et al.*, 2007), avaliação do estado nutricional pelo Formulário de Marcadores do Consumo Alimentar (indica a frequência de consumo de 10 grupos de alimentos nos dias de uma semana normal) (Damé *et al.*, 2011) e para avaliação socioeconômica foi utilizado o Critério de Classificação Econômica Brasil, da Associação Brasileira de Empresas de pesquisa – ABEP (que avalia o poder de compra do consumidor) (Abep, 2014).

3.3. Biópsia

O tecido adiposo subcutâneo abdominal foi coletado por médico treinado sob anestesia local (lidocaína 2%), depois de adequada antissepsia com clorexidina 2%. A excisão foi feita próximo à cicatriz umbilical, foi retirado cerca de 0,5 g de tecido adiposo, armazenado em nitrogênio líquido e então levado para o laboratório para análises posteriores. Os participantes foram orientados a não realizar atividades físicas no dia da colheita e tomarem café da manhã até 8h e ficarem em jejum até a coleta, que ocorreu entre 12h e 13h.

3.4. Extração de RNA

Parte do tecido (50-100 mg) foi macerado usando pistilo e gral, os fragmentos foram transferidos para um tubo de 1.5 ml contendo 1.0 ml de Trizol (Invitrogen), e homogeneizados vigorosamente. Foi adicionado 200 µl de clorofórmio, homogeneizado lentamente por 15 segundos, e deixado para descansar por 2-3 min. Após o tempo repousando, foi centrifugado a 4° C, 12.000 RPM por 15 min, e foi transferido a fase aquosa para outro tubo. Foi adicionado 500 µl de isopropanol, seguido de repouso durante 10 min, centrifugado a 4° C, 12.000 RPM durante 10 min e após a centrifugação, foi desprezado o sobrenadante.

Foi adicionado 1 ml de etanol 75% ao precipitado, centrifugado a 7.500 RPM por 5 min, e o sobrenadante descartado. Após, foi deixado para secar no ar por cerca de 10 min, o precipitado ressuspenso com 20 µl de água ultra pura

e homogeneizado. A quantificação do RNA foi feita utilizando um espectrofotômetro (Nanodrop, ThermoScientific - GE). Além disso, a integridade das amostras foi testada por eletroforese em gel de agarose 1%, com tampão TAE 1X, 100 mV (milivolts) por 40 min e coradas com corante GEL RED (Uniscience). Antes das análises as amostras foram armazenadas a -80°C (Spener *et al.*, 2011). Todas as etapas de manipulação do RNA foram realizadas no gelo.

3.5. Síntese de cDNA a partir de mRNA

DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por meio da transcriptase reversa utilizando os reagentes da Invitrogen, seguindo as instruções do fabricante. 500 ng de RNA total foi utilizado e completado com água ultra pura para um volume final de 10 µl. Após, foi adicionado um mix contendo 1.0 µl de RT buffer (10X), 2.2 µl de MgCl₂ (25 mM), 2.0 µl de dNTPs (2,5 umol total), 0.5 µl de hexâmeros aleatórios (50 µM), 1 µl de inibidor de RNase (0.4U/µl) e 0.25 µl de MultiScribe transcriptase reversa (50 U/µl), para uma solução final de 20 µl. As condições para PCR foram: 25° C por 10 min, 120 min a 37° C e por fim, 5 min a 85° C.

3.6. Análise da expressão de mRNA

Para análise da expressão de mRNA de FTO, o cDNA foi amplificado utilizando Power SYBR Green PCR Master Mix (Cat. No: 4367659, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segundo protocolo do fabricante para qPCR. Para 20 µl de reação final havia 10 µl de Power SYBR Green PCR Master Mix (2x), concentração de 250 nM para os primers forward 5'-CTGGCCAGTGAAAGGGTCTAAT-3' e reverse 5'-GGCAGCAAGTTCTTCCAAAGC-3' (FTO) e forward 5'-CTCTTCCTTTCTCCGCCATC-3' e reverse 5'-TCCAGTTTTTCATCCGAATCCAC-3' (RPL 39 - controle endógeno) e concentração de 100 ng de cDNA. As amostras foram incubadas a 95° C por 10 min, 10 segundos a 95° C e 60 segundos a 60° C (40 ciclos). A fluorescência emitida em cada ciclo pelo SYBR Green foi monitorada e a expressão do mRNA

calculada pela normalização da expressão do controle endógeno, método $\Delta\Delta CT$ (Klötting *et al.*, 2008; Baraldi *et al.*, 2016).

3.7. Análise bioinformática para predição da interação entre miRs e a região 3' UTR de mRNA do gene FTO

A análise bioinformática da interação entre miRs com a região 3' UTR de mRNA de FTO foi realizada utilizando a ferramenta disponível online (<http://mirdb.org/>), que gera dados referentes a interação entre miRs e a região 3' UTR do gene de interesse. Para a análise dos dados foi inserido o número de acesso do gene de interesse FTO (ID: 79068) e os resultados gerados são dados em *scores*, sendo que *scores* acima de 80 tem maior chance de serem reais (Wong e Wang, 2014). Para posterior análises selecionamos o hsa-miR-150-5p, que apresentou um *score* de 85 e estudos na literatura relacionam com obesidade (Olivo-Marston *et al.*, 2014; Ying *et al.*, 2016). Além disso, também utilizamos *RNAhybrid*, ferramenta online que leva em consideração a formação da estrutura secundária (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid>), para verificar o paramento do miRNA : mRNA de FTO (Rehmsmeier *et al.*, 2004).

3.8. Síntese de cDNA a partir de miRNA

O cDNA foi sintetizado utilizando TaqMan® MicroRNA Reverse transcription kit (Cat. No: 4366596 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para 15 µl (master mix, primer e RNA total) de reação por amostra, foram utilizados os seguintes reagentes: 0.15 µl de dNTPs (100mM), 1 µl de MultiScribe reverse transcriptase (50 U/µl), 1.50 µl de RT buffer (10x), 0.19 µl de inibidor de RNase (20 U/µl) e 4.16 de água DPEC, totalizando 7 µl de mix. Em 5 µl de RNA total foi adicionado o master mix e 3 µl de primers RT stem loop específico (Cat.No: 4427975). As condições da pcr foram: 30 min a 16 °C, 30 min a 42 °C e 5 min a 85 °C.

3.9. Análise da expressão de miRNA

1 µl TaqMan MicroRNA Assay (Cat.No: 4427975) [hsa-miR-150-5p #000473; hsa-miR-103 #000439], 1.33 µl do produto da transcriptase reversa, 10 µl de TaqMan 2 × Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Cat.No: 4324018) e 7.67 µl de água DPEC foram adicionados, totalizando 20 µl por reação. As condições foram: 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 60 segundos a 60 °C. Expressão do miRNA alvo foi normalizada em relação à expressão do hsa-miR-103 pelo método $\Delta\Delta CT$ (Klötting *et al.*, 2008; Baraldi *et al.*, 2016).

3.10. Análise estatística

Inicialmente realizou-se uma análise exploratória dos dados, com o objetivo básico de sumarizar os valores, organizando e descrevendo os dados em tabelas com medidas descritivas. As variáveis contínuas foram expressas em termos de estatísticas descritivas básicas (média, mediana, desvio padrão e entre outras), já as variáveis categóricas estão expressas em termos de frequência e percentual.

Para atingir os objetivos propostos utilizou-se:

- Para verificar a correlação entre as variáveis utilizou-se: coeficiente de correlação de Pearson, que quantifica a associação entre duas variáveis quantitativas. Este coeficiente varia entre os valores -1 e 1. O valor 0 (zero) significa que não há relação linear, o valor 1 indica uma relação linear perfeita e o valor -1 também indica uma relação linear perfeita mas inversa, ou seja quando uma das variáveis aumenta a outra diminui. Quanto mais próximo estiver de 1 ou -1, mais forte é a associação linear entre as duas variáveis;
- Modelos de regressão linear múltiplo, empregado para estudar a relação entre uma única variável dependente e diversas variáveis independentes. Esse modelo tem como pressuposto que seus resíduos tenham distribuição normal com média 0 e variância constante;
- Test t de *Student* para comparar os níveis de expressão entre os grupos eutrófico e sobrepeso/obesidade;

- Modelo de regressão linear para estudar a relação entre os níveis de expressão do gene FTO com o hsa-mir-150;

Nestas análises considerou-se um nível de significância de 5% e os ajustes foram obtidos no software SAS (versão 9.2) e também no programa estatístico *Prism* (versão 5.0).

Resultados

a seleção do hsa-mir-150-5p. Lista de todos os miRs gerados antes da seleção está disponível na seção apêndice.

4.2. Diferenças entre as variáveis antropométricas nos grupos eutrófico e com sobrepeso/obesidade

Descrição dos dados antropométricos dos participantes está apresentada na Tabela 2. E foi encontrada diferença entre os dois grupos para todas as variáveis (IMC, % de gordura, CC e CQ).

Tabela 2: Diferenças nas variáveis antropométricas entre os grupos eutrófico e com sobrepeso/obesidade

	<i>Eutrófico</i>	<i>Sobrepeso/obeso</i>
<i>IMC (kg/m²)</i>	21.36 ± 1.055 (5)	34.24 ± 1.462* (14)
<i>% de gordura</i>	28.82 ± 1.434 (5)	48.44 ± 1.977* (14)
<i>CC (cm)</i>	71.00 ± 3.688 (5)	98.58 ± 2.417* (12)
<i>CQ (cm)</i>	95.00 ± 2.933 (5)	116.4 ± 3.093* (12)

Dados estão apresentados como média ± desvio padrão e número amostral entre parênteses. * $p \leq 0.05$. CC – circunferência de cintura; CQ – circunferência de quadril.

4.3. Correlações com obesidade, perfil lipídico e glicemia

Após a seleção do mir-hsa-150, foram realizadas correlações entre as variáveis relacionadas a obesidade (IMC, % de gordura, CC, glicemia de jejum, HDL, triglicérides, colesterol total e LDL) com a expressão do gene FTO (Tabela 3) e do hsa-mir-150 (Tabela 4). Foi encontrada correlação entre a expressão do gene FTO e as variáveis IMC e LDL. No entanto, não foi encontrada correlação entre a expressão do hsa-mir-150 e as variáveis acima mencionadas.

Tabela 3: Correlações entre a expressão do gene FTO com obesidade, perfil lipídico e glicemia

	Expressão FTO
IMC (kg/m²)	0.49948
	0.0295*
	19
% de gordura	0.45431
	0.0507
	19
CC (cm)	0.47560
	0.0537
	17
Glicemia de jejum (mg/dL)	0.10827
	0.7009
	15
HDL (mg/dL)	0.32353
	0.2395
	15
Triglicérides (mg/dL)	-0.11331
	0.6876
	15
Colesterol (mg/dL)	-0.33993
	0.2151
	15
LDL (mg/dL)	-0.53879
	0.0382*
	15

Dados estão apresentados como coeficiente de correlação de *Pearson*, valor de p e número amostral. * $p \leq 0.05$. CC – circunferência de cintura; CQ – circunferência de quadril.

Tabela 4: Correlações entre a expressão do mir-150 com obesidade, perfil lipídico e glicemia

	<i>Expressão hsa-mir-150</i>
IMC (kg/m²)	-0.05180 0.8382 18
% de gordura	-0.29403 0.2363 18
CC (cm)	0.07697 0.7769 16
Glicemia de jejum (mg/dL)	0.23275 0.4233 14
HDL (mg/dL)	0.09514 0.7463 14
Triglicérides (mg/dL)	-0.16591 0.5708 14
Colesterol (mg/dL)	0.19317 0.5082 14
LDL (mg/dL)	0.28886 0.3165 14

Dados estão apresentados como coeficiente de correlação de *Pearson*, valor de p e número amostral. * $p \leq 0.05$. CC – circunferência de cintura; CQ – circunferência de quadril.

4.4. Regressões com IMC, LDL e glicemia

A partir das correlações entre as expressões do miR e do mRNA com as variáveis de obesidade selecionadas no estudo, realizamos regressões múltiplas para as variáveis que apresentaram correlação entre elas e mais a glicemia de jejum. Glicemia foi escolhida por sua possível relação com FTO (Church *et al.*, 2010). Observamos a expressão do mRNA de FTO estar relacionada a LDL e glicemia de jejum (Tabela 5). Já para a expressão do miR, não encontramos estar relacionada a nenhuma das variáveis em questão (Tabela 6).

Tabela 5: Regressão múltipla entre mRNA de FTO e IMC, LDL e glicemia de jejum.

Variável	Estimativa	p	Intervalo de confiança	
IMC (kg/m²)	0.141 ± 0.066	0.07	-0.012	0.294
LDL (mg/dL)	-0.047 ± 0.016*	0.02	-0.084	-0.010
Glicemia de jejum (mg/dL)	0.114 ± 0.04*	0.02	0.021	0.207

Dados estão ajustados por nível de atividade física e qualidade da alimentação. Dados estão apresentados como estimativa ± desvio padrão, valor de *p* e intervalo de confiança para 95%. * $p \leq 0.05$.

Tabela 6: Regressão múltipla entre o miR e IMC, LDL e glicemia de jejum.

Variável	Estimativa	p	Intervalo de confiança	
IMC (Kg/m2)	0.017 ± 0.013	0.24	-.0145	0.048
LDL (mg/dL)	0.003 ± 0.003	0.45	-.005	0.011
Glicemia de jejum (mg/dL)	0.004 ± 0.008	0.60	-.014	0.023

Dados estão ajustados por nível de atividade física e qualidade da alimentação. Dados estão apresentados como estimativa ± desvio padrão, valor de *p* e intervalo de confiança para 95%. * $p \leq 0.05$.

4.5. Expressão mRNA entre os grupos

Fizemos a comparação entre a expressão do mRNA em indivíduos eutróficos e com sobrepeso/obesidade. Não observamos diferença na expressão entre os grupos (Figura 6).

Figura 6: Expressão relativa do gene FTO em indivíduos com sobrepeso/obesos e eutróficos – Expressão relativa do gene FTO ao gene RPL39 em indivíduos com sobrepeso/obesidade e eutróficos. Gráfico apresentado como média $\pm$ desvio padrão, * $p \leq 0.05$ ($p = 0.14$). Sp (sobrepeso).

4.6. Expressão miRNA entre os grupos

Realizamos a comparação entre a expressão do miR em indivíduos eutróficos e com sobrepeso/obesidade. Não observamos diferença na expressão entre os grupos (Figura 7).

Figura 7: Expressão relativa do miRNA 150 em indivíduos com sobrepeso/obesidade e eutróficos – Expressão relativa do miRNA 150 ao miRNA 103 em indivíduos com sobrepeso/obesidade. Gráfico apresentado como média $\pm$ desvio padrão, * $p \leq 0.05$ ($p = 0.5$). Sp (sobrepeso).

4.7. Regressão entre mRNA e miRNA

Realizamos regressão linear entre a expressão do miR e do mRNA. Não encontramos relação entre as duas variáveis (Figura 8).

Figura 8: Relação entre mRNA de FTO e miRNA 150 – Regressão linear entre expressão de mRNA de FTO e miRNA 150, $p \geq 0.05$.

Discussão

5. Discussão

O presente trabalho que teve como objetivos verificar relação entre a expressão do hsa-mir-150 e do gene FTO com variáveis da obesidade, diferenças no padrão de expressão do mir-150 e do gene FTO entre indivíduos magros e com sobrepeso/obesidade e buscar possível relação entre a expressão do mir-150 e do gene FTO. Demonstramos que a expressão do gene FTO está correlacionada com IMC, LDL e nível glicêmico. Por outro lado o mir-150 não se mostrou estar correlacionado ou relacionado com as variáveis da obesidade. Também não identificamos diferença na expressão do mir-150 e do gene FTO entre os grupos de indivíduos magros e com sobrepeso/obesidade e relação entre a expressão dos mesmos.

O gene FTO foi o primeiro gene associado à obesidade, sendo tal associação demonstrada por diversas vezes (Frayling *et al.*, 2007; Scuteri *et al.*, 2007; Loos e Yeo, 2014). De forma semelhante, demonstramos o gene FTO estar correlacionado com o LDL e IMC, e associado com glicemia de jejum e LDL, variáveis estas que em geral se mostram alteradas na obesidade. As variáveis utilizadas nas regressões múltiplas foram ajustadas pelo nível de atividade física e qualidade da alimentação, e devido ao ajuste acreditamos não ter visto relação com IMC, apenas correlação. Mesmo motivo que explicaria ter encontrado relação com glicemia de jejum e não correlação. Samaras *et al.* (2010), em um estudo com uma proposta similar ao de nosso estudo, demonstraram a expressão do gene FTO em tecido adiposo subcutâneo estar relacionada com glicemia de jejum, circunferência da cintura, TNF- α (fator de necrose tumoral α) e NF- $\kappa\beta$ (fator nuclear kappa β). Zabena *et al.* (2009), estudando a expressão do gene FTO em indivíduos magros e obesos, demonstraram correlação inversa entre a expressão do mRNA e nível de triglicerídeos. Já Klöting *et al.* (2008) demonstraram a expressão do gene FTO estar relacionada de forma inversa ao IMC e porcentagem de gordura corporal.

Com relação ao hsa-mir-150 não identificamos estar associado com nenhuma das variáveis estudadas no presente trabalho. Apesar de diversos trabalhos mostrando o papel do mir-150 no tecido adiposo e em processos

relacionados ao mesmo, não identificamos trabalhos com uma proposta semelhante à apresentada no nosso.

Posteriormente, apresentamos a comparação da expressão de mRNA de FTO nos participantes eutróficos e nos participantes com sobrepeso/obesidade. Não foi encontrada diferença entre os grupos, no entanto é válido ressaltar que apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, o grupo com sobrepeso e obesidade apresentou expressão aproximadamente 50% maior que o grupo eutrófico. Os trabalhos anteriormente apresentados foram os únicos que encontramos medindo a expressão do gene FTO em humanos, sendo que apenas dois compararam a expressão entre eutróficos e obesos (Zabena *et al.*, 2009; Samaras *et al.*, 2010), demonstrando maior expressão do gene FTO em obesos mórbidos e não apresentando diferença entre indivíduos eutróficos e obesos. Apesar de entre os dois estudos apresentados apenas um apresentar o mesmo resultado que o nosso, creditamos isso devido à população se assemelhar mais a nossa (obesos) do que no outro trabalho que encontrou diferença, no qual realizaram estudo com obesos mórbidos. Dessa forma, sugere-se que quando maior a massa gorda, maior a expressão do gene FTO.

Além do mecanismo já apresentado no tópico introdução, de forma hipotética, outros mecanismos na regulação da obesidade são propostos para o gene FTO. Wu *et al.* (2010) propõem que o FTO poderia alterar padrões epigenéticos, agindo como um coativador transcricional e também no recrutamento de DNA demetilases influenciando na expressão gênica. Durante a fase de início de transcrição de um gene, o FTO recrutaria fatores que reconheceriam 5-metilcitosinas, que por sua vez fariam a excisão e correção desse nucleotídeo, permitindo o acesso do complexo de transcrição, transcrevendo um gene que poderia estar relacionado à obesidade. Da mesma forma, Lin *et al.* (2014) propõem a regulação da obesidade por meio da interação entre FTO e CaMKII (proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina), fazendo com que ocorra o aumento da fosforilação de CREB (elemento de resposta a cAMP), que por sua vez regularia a expressão de NPY e BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), conhecidos por regular a ingestão alimentar e gasto energético.

Na comparação da expressão do mir-150 nos participantes eutróficos e com sobrepeso ou obesidade, também não foi encontrada diferença entre os

grupos. MiRs podem regular a expressão de diversos genes, podendo ser tecido específico ou dependente de alguma condição específica, assim podendo um único miR estar envolvido em diversos processos. Dessa forma, se apresenta de forma limitada trabalhos na literatura sobre o papel de um miR específico em um único processo biológico. No entanto, o mir-150 parece estar envolvido em diversos processos metabólicos. Dahlmans *et al.* (2017), em um trabalho buscando encontrar miRs que pudessem estar envolvidos na regulação do metabolismo mitocondrial no músculo esquelético, demonstraram o mir-150-5p estar envolvido na regulação positiva do metabolismo mitocondrial - a função mitocondrial quando prejudicada está relacionada a diabetes tipo II e resistência à insulina. De forma análoga, os autores compararam a expressão dos miRs identificados anteriormente em indivíduos com diferentes níveis de atividade física e composição corporal, demonstrando o mir-150-5p estar mais expresso em atletas do que em indivíduos com sobrepeso e obesidade.

Ying *et al.* (2016), estudando o papel do mir-150 na inflamação e resistência à insulina decorrente da obesidade, demonstraram que camundongos alimentados com dieta hipercalórica e nocautes para este miR apresentavam perfil inflamatório aumentado quando comparados aos que eram alimentados com a mesma dieta, mas não eram nocautes. Além disso, os camundongos nocautes apresentavam hiperglicemia, hiperinsulinemia, intolerância à glicose e resistência à insulina induzida pela obesidade quando comparados ao não nocautes. E os perfis dos camundongos nocautes apresentados no trabalho se dariam devido a um papel que o mir-150 teria na regulação de genes envolvidos na ativação dos receptores envolvidos na cascata de sinalização das células B. Essa alteração na função das células B altera a ativação de macrófagos e células T, afetando a função dos adipócitos.

Por outro lado Kang *et al.* (2018), estudando o efeito do nocaute do mir-150 no metabolismo e no tecido adiposo, demonstraram que o nocauteamento desse miR em camundongos resultava em uma menor massa corporal e ingesta alimentar do que em camundongos selvagens, com consequente melhora na sensibilidade à insulina e tolerância à glicose. Os autores atribuem esse resultado ao aumento de PGC1- α e mTOR (alvos do mir-150) - dessa forma se dava o aumento de leptina, atuando no controle da fome e saciedade e de genes envolvidos a beta oxidação de ácidos graxos e síntese de triglicerídeos. Apesar

de resultado obtido por Kang *et al.* (2018) ser contrário ao apresentado no estudo mencionado anteriormente, Ying *et al.* (2016) sugerem o resultado ser dependente de obesidade induzida pela alimentação.

Chou *et al.* (2014), estudando o papel de uma proteína regulatória (KSRP-proteína reguladora de splicing tipo KH) envolvida no processamento do pri-miRNA de miRs, demonstrou que a deleção dessa proteína regulatória aumentava a expressão de genes envolvidos no remodelamento do tecido adiposo branco em tecido adiposo marrom e de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos e isso se dava porque a deleção dessa proteína regulava negativamente o mir-150.

Por fim, testamos a relação entre a expressão do hsa-mir-150 e do gene FTO, não encontrando relação entre as duas variáveis, o que de forma hipotética sugeriria que o mir-150 não estaria envolvido na regulação do mRNA de FTO.

Visto que a literatura é escassa de informação sobre regulação de FTO, relação de sua expressão com a obesidade em humanos, como também o envolvimento do hsa-mir-105 na obesidade, o presente trabalho buscou trazer novos resultados para a literatura de forma a incentivar pesquisas sobre esta importante doença. No entanto duas sérias limitações podem ser mencionadas, pois podem ter influências direta nas conclusões obtidas – a primeira é com relação ao número de indivíduos participantes no estudo. Atribui-se tal limitação principalmente à falta de aderência ao procedimento da biópsia, dificuldade na reserva de espaço específico para coleta do tecido, disponibilidade médica para realização do procedimento. A segunda limitação seria a falta de um experimento *in vivo* para estudar a interação entre o miR e o mRNA do gene em questão. Tal dificuldade se deu por não contarmos com tal estrutura em nosso laboratório e devido a tempo limitado para realização deste projeto não foi possível conseguirmos uma parceria para realização de tal experimento, mas consideramos a realização de tal experimento para uma futura publicação, acreditando que isso poderia ser de grande valia para a confirmação de nossos resultados.

Conclusão

6. Conclusão

Com os resultados obtidos no presente trabalho concluímos o gene FTO está relacionado à obesidade, LDL e glicemia de jejum, diferentemente do hsa-mir-150-5p.

Referências

7. Referências

ABEP. **Critério de classificação econômica Brasil 2014**. Disponível em www.abep.org. acesso em: 18/07/18.

AZEVEDO, E. C. D. C. et al. Consumo alimentar de risco e proteção para as doenças crônicas não transmissíveis e sua associação com a gordura corporal: um estudo com funcionários da área de saúde de uma universidade pública de Recife (PE), Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 19, p. 1613-1622, 2014. ISSN 1413-8123.

BARALDI, F. G. et al. The combination of Conjugated Linoleic Acid (CLA) and extra virgin olive oil increases mitochondrial and body metabolism and prevents CLA-associated insulin resistance and liver hypertrophy in C57Bl/6 mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 28, p. 147-154, 2016. ISSN 0955-2863.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004. ISSN 0092-8674.

BERULAVA, T.; HORSTHEMKE, B. The obesity-associated SNPs in intron 1 of the FTO gene affect primary transcript levels. *European Journal of Human Genetics*, v. 18, n. 9, p. 1054-1056, 2010. ISSN 1476-5438.

BETEL, D. et al. The microRNA. org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Research*, v. 36, n. suppl_1, p. D149-D153, 2008. ISSN 0305-1048.

BRASIL, V. Hábitos dos brasileiros impactam no crescimento da obesidade e aumenta prevalência de diabetes e hipertensão 2016.

BRODERSEN, P.; VOINNET, O. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 10, n. 2, p. 141-148, 2009. ISSN 1471-0080.

CALIN, G. A. et al. Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas. *Cancer Cell*, v. 12, n. 3, p. 215-229, 2007. ISSN 1535-6108.

CHEN, J. et al. Fat Mass and Obesity-Associated (FTO) Gene Polymorphisms Are Associated with Risk of Intervertebral Disc Degeneration in Chinese Han Population: A Case Control Study. *Medical Science Monitor: International*

Medical Journal of Experimental and Clinical Research, v. 24, p. 5598-5609, 2018.

CHEN, X. et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. Cell Research, v. 18, n. 10, p. 997-1006, 2008. ISSN 1748-7838.

CHEUNG, M. et al. FTO expression is regulated by availability of essential amino acids. International Journal of Obesity, v. 37, n. 5, p. 744-747, 2013. ISSN 1476-5497.

CHOU, C.-F. et al. KSRP ablation enhances brown fat gene program in white adipose tissue through reduced miR-150 expression. Diabetes, p. DB_131901, 2014. ISSN 0012-1797.

CHURCH, C. et al. Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. Nature Genetics, v. 42, n. 12, p. 1086-1092, 2010. ISSN 1546-1718.

CORELLA, D. et al. Statistical and biological gene-lifestyle interactions of MC4R and FTO with diet and physical activity on obesity: new effects on alcohol consumption. PloS One, v. 7, n. 12, p. e52344, 2012. ISSN 1932-6203.

DAHLMANS, D. et al. An unbiased silencing screen in muscle cells identifies miR-320a, miR-150, miR-196b, and miR-34c as regulators of skeletal muscle mitochondrial metabolism. Molecular Metabolism, v. 6, n. 11, p. 1429-1442, 2017. ISSN 2212-8778.

DAMÉ, P. K. V. et al. Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional (SISVAN) em crianças do Rio Grande do Sul, Brasil: cobertura, estado nutricional e confiabilidade dos dados. Cadernos de Saúde Pública, v. 27, p. 2155-2165, 2011. ISSN 0102-311X.

DE LIMA AUGUSTEMAK, L.; RECH, C. R.; PETROSKI, E. L. Use of bioelectrical impedance for the estimation of skeletal muscle mass in elderly men. Archivos Latinoamericanos de Nutricion, v. 58, n. 4, p. 386-391, 2008. ISSN 0004-0622.

DING, C. et al. Increased N6-methyladenosine causes infertility is associated with FTO expression. Journal of Cellular Physiology, v. 233, n. 9, p. 7055-7066, 2018. ISSN 0021-9541.

FISCHER, J. et al. Inactivation of the Fto gene protects from obesity. Nature, v. 458, n. 7240, p. 894-898, 2009. ISSN 1476-4687.

FRANCISCHI, R. P. P. D. et al. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. *Revista de Nutrição*, 2000. ISSN 1415-5273.

FRANKEL, L. B. et al. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 2, p. 1026-1033, 2008. ISSN 0021-9258.

FRAYLING, T. M. et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*, 2007. ISSN 0036-8075.

FRIEDMAN, J. M. Obesity in the new millennium. *Nature*, v. 404, n. 6778, p. 632-634, 2000. ISSN 1476-4687.

GAO, X. et al. The fat mass and obesity associated gene FTO functions in the brain to regulate postnatal growth in mice. *PloS One*, v. 5, n. 11, p. e14005, 2010. ISSN 1932-6203.

GERKEN, T. et al. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science*, v. 318, n. 5855, p. 1469-1472, 2007. ISSN 0036-8075.

GULATI, P. et al. Role for the obesity-related FTO gene in the cellular sensing of amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 7, p. 2557-2562, 2013. ISSN 0027-8424.

JIA, G. et al. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature Chemical Biology*, v. 7, n. 12, p. 885-887, 2011. ISSN 1552-4469.

JOHNSON, R. et al. A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, v. 29, n. 3, p. 438-445, 2008. ISSN 0969-9961.

KANG, M. et al. Improved systemic metabolism and adipocyte biology in miR-150 knockout mice. *Metabolism-Clinical and Experimental*, v. 83, p. 139-148, 2018. ISSN 0026-0495.

KHEIR, T. B. et al. miR-449 inhibits cell proliferation and is down-regulated in gastric cancer. *Molecular Cancer*, v. 10, n. 1, p. 29, 2011. ISSN 1476-4598.

KLÖTING, N. et al. Inverse relationship between obesity and FTO gene expression in visceral adipose tissue in humans. *Diabetologia*, v. 51, n. 4, p. 641-647, 2008. ISSN 0012-186X.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. *Nature*, v. 404, n. 6778, p. 635-643, 2000. ISSN 1476-4687.

KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILIPOWICZ, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, n. 9, p. 597-610, 2010. ISSN 1471-0064.

KUNG, C.-P. et al. The P72R polymorphism of p53 predisposes to obesity and metabolic dysfunction. *Cell Reports*, v. 14, n. 10, p. 2413-2425, 2016. ISSN 2211-1247.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993. ISSN 0092-8674.

LEGRY, V. et al. Effect of an FTO polymorphism on fat mass, obesity, and type 2 diabetes mellitus in the French MONICA Study. *Metabolism*, v. 58, n. 7, p. 971-975, 2009. ISSN 0026-0495.

LIN, L. et al. Fat mass and obesity-associated (FTO) protein interacts with CaMKII and modulates the activity of CREB signaling pathway. *Human Molecular Genetics*, v. 23, n. 12, p. 3299-3306, 2014. ISSN 1460-2083.

LIU, J. et al. m6A demethylase FTO facilitates tumor progression in lung squamous cell carcinoma by regulating MZF1 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018. ISSN 0006-291X.

LIZARBE, B. et al. Hypothalamic metabolic compartmentation during appetite regulation as revealed by magnetic resonance imaging and spectroscopy methods. *Frontiers in Neuroenergetics*, v. 5, p. 6, 2013. ISSN 1662-6427.

LOCKE, A. E. et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature*, v. 518, n. 7538, p. 197-206, 2015. ISSN 1476-4687.

LOOS, R. J.; YEO, G. S. The bigger picture of FTO—the first GWAS-identified obesity gene. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 10, n. 1, p. 51-61, 2014. ISSN 1759-5037.

MACFARLANE, L. A.; MURPHY, P. R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*, v. 11, n. 7, p. 537-61, Nov 2010. ISSN 1875-5488

MUST, A. et al. The disease burden associated with overweight and obesity. *Jama*, v. 282, n. 16, p. 1523-1529, 1999. ISSN 0098-7484.

OLIVO-MARSTON, S. E. et al. Effects of calorie restriction and diet-induced obesity on murine colon carcinogenesis, growth and inflammatory factors, and microRNA expression. *PloS One*, v. 9, n. 4, p. e94765, 2014. ISSN 1932-6203.

OMS. World Health Organization obesity and overweight fact sheet 2016.

PAKPOUR, A. H.; YEKANINEJAD, M. S.; CHEN, H. Mothers' perception of obesity in schoolchildren: a survey and the impact of an educational intervention. *Jornal de Pediatria*, v. 87, n. 2, p. 169-174, 2011. ISSN 0021-7557.

PALMERO, E. I. et al. Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and progression. *Genetics and Molecular Biology*, v. 34, n. 3, p. 363-370, 2011. ISSN 1415-4757.

RAVUSSIN, E. Metabolic differences and the development of obesity. *Metabolism-Clinical and Experimental*, v. 44, p. 12-14, 1995. ISSN 0026-0495.

RECH, D. C. et al. As políticas públicas e o enfrentamento da obesidade no Brasil: uma revisão reflexiva. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, v. 1, n. 1, p. 192-202, 2016. ISSN 2238-3360.

REHMSMEIER, M. et al. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *Rna*, v. 10, n. 10, p. 1507-1517, 2004. ISSN 1355-8382.

ROSSI, C. E. et al. Influência da televisão no consumo alimentar e na obesidade em crianças e adolescentes; uma revisão sistemática Television influence on food intake and obesity in children and adolescents; a systematic review. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 607-620, 2010. ISSN 1415-5273.

SAMARAS, K. et al. Subcutaneous and visceral adipose tissue FTO gene expression and adiposity, insulin action, glucose metabolism, and inflammatory adipokines in type 2 diabetes mellitus and in health. *Obesity Surgery*, v. 20, n. 1, p. 108-113, 2010. ISSN 0960-8923.

SCHWARTZ, M. W.; MORTON, G. J. Obesity: keeping hunger at bay. *Nature*, v. 418, n. 6898, p. 595-597, 2002. ISSN 1476-4687.

SCUTERI, A. et al. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. PLoS Genetics, v. 3, n. 7, p. e115, 2007. ISSN 1553-7404.

SEGAL, A.; CARDEAL, M. V.; CORDÁS, T. A. Aspectos psicossociais e psiquiátricos da obesidade. Revista de Psiquiatria Clínica, v. 29, n. 2, p. 81-89, 2002.

SIGURDSON, A. J. et al. Selected single-nucleotide polymorphisms in FOXE1, SERPINA5, FTO, EVPL, TICAM1 and SCARB1 are associated with papillary and follicular thyroid cancer risk: replication study in a German population. Carcinogenesis, v. 37, n. 7, p. 677-684, 2016. ISSN 1460-2180.

SILVA, R.; SIMÕES, M. J. S.; LEITE, A. A. Fatores de risco para doenças cardiovasculares em idosos com diabetes mellitus tipo 2. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, p. 113-121, 2007. ISSN 1808-4532.

SPEAKMAN, J. R.; RANCE, K. A.; JOHNSTONE, A. M. Polymorphisms of the FTO gene are associated with variation in energy intake, but not energy expenditure. Obesity, v. 16, n. 8, p. 1961-1965, 2008. ISSN 1930-7381.

SPENER, R. F. et al. Adiponectin expression in epicardial adipose tissue after percutaneous coronary intervention with bare-metal stent. Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery, v. 26, n. 3, p. 427-432, 2011. ISSN 0102-7638.

STRUBBERG, A. M.; MADISON, B. B. MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: Pathways and clinical implications. Disease models & mechanisms, v. 10, n. 3, p. 197-214, 2017. ISSN 1754-8403.

TAN, A. et al. Overexpression of the fat mass and obesity associated gene (FTO) in breast cancer and its clinical implications. International journal of clinical and experimental pathology, v. 8, n. 10, p. 13405-13410, 2015.

THUM, T. et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. Nature, v. 456, n. 7224, p. 980-984, 2008. ISSN 1476-4687.

TRANG, P. et al. Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. Molecular Therapy, v. 19, n. 6, p. 1116-1122, 2011. ISSN 1525-0016.

TREWICK, S. C. et al. Oxidative demethylation by Escherichia coli AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature*, v. 419, n. 6903, p. 174-178, 2002. ISSN 1476-4687.

WÅHLÉN, K.; SJÖLIN, E.; HOFFSTEDT, J. The common rs9939609 gene variant of the fat mass-and obesity-associated gene FTO is related to fat cell lipolysis. *Journal of Lipid Research*, v. 49, n. 3, p. 607-611, 2008. ISSN 0022-2275.

WANDERLEY, E. N.; FERREIRA, V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. *Ciencia & Saude Coletiva*, v. 15, p. 185-194, 2010. ISSN 1413-8123.

WANG, W.-X. et al. The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *Journal of Neuroscience*, v. 28, n. 5, p. 1213-1223, 2008. ISSN 0270-6474.

WONG, N.; WANG, X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. D1, p. D146-D152, 2014. ISSN 1362-4962.

WU, Q. et al. The obesity-associated Fto gene is a transcriptional coactivator. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 401, n. 3, p. 390-395, 2010. ISSN 0006-291X.

XU, D. et al. FTO expression is associated with the occurrence of gastric cancer and prognosis. *Oncology Reports*, v. 38, n. 4, p. 2285-2292, 2017. ISSN 1021-335X.

YING, W. et al. miR-150 regulates obesity-associated insulin resistance by controlling B cell functions. *Scientific Reports*, v. 6, p. 20176, 2016. ISSN 2045-2322.

ZABENA, C. et al. The FTO obesity gene. Genotyping and gene expression analysis in morbidly obese patients. *Obesity Surgery*, v. 19, n. 1, p. 87-95, 2009. ISSN 0960-8923.

ZHU, Y. et al. Estrogen promotes fat mass and obesity-associated protein nuclear localization and enhances endometrial cancer cell proliferation via the mTOR signaling pathway. *Oncology Reports*, v. 35, n. 4, p. 2391-2397, 2016. ISSN 1021-335X.

Apêndices

8. Apêndices

8.1. Apêndice A – Gel de integridade

Figura 9: Gel de integridade para algumas amostras de RNA – gel de integridade para algumas amostras selecionadas aleatoriamente e numeradas na parte inferior da imagem. No canto direito da imagem encontra-se a marcação do padrão de banda referentes aos RNAs ribossomais 28s e 18s, referências como indicadores de integridade.

8.2. Apêndice B – Lista de possíveis miRs interagindo com a região 3' UTR de FTO

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol	Gene Description
Details	1	98	hsa-miR-3153	FTO	fat mass and obesity associated
Details	2	94	hsa-miR-6813-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	3	94	hsa-miR-6085	FTO	fat mass and obesity associated
Details	4	94	hsa-miR-4284	FTO	fat mass and obesity associated
Details	5	93	hsa-miR-4744	FTO	fat mass and obesity associated
Details	6	93	hsa-miR-1275	FTO	fat mass and obesity associated
Details	7	92	hsa-miR-4492	FTO	fat mass and obesity associated
Details	8	92	hsa-miR-6738-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	9	91	hsa-miR-6739-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	10	91	hsa-miR-6733-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	11	90	hsa-miR-5787	FTO	fat mass and obesity associated
Details	12	89	hsa-miR-1322	FTO	fat mass and obesity associated
Details	13	86	hsa-miR-6818-3p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	14	85	hsa-miR-3915	FTO	fat mass and obesity associated
Details	15	85	hsa-miR-150-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	16	81	hsa-miR-216b-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	17	80	hsa-miR-6809-3p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	18	78	hsa-miR-4505	FTO	fat mass and obesity associated

Details	19	77	hsa-miR-4665-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	20	77	hsa-miR-1914-3p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	21	77	hsa-miR-5194	FTO	fat mass and obesity associated
Details	22	76	hsa-miR-4680-3p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	23	75	hsa-miR-5001-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	24	75	hsa-miR-762	FTO	fat mass and obesity associated
Details	25	75	hsa-miR-887-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	26	75	hsa-miR-4498	FTO	fat mass and obesity associated
Details	27	73	hsa-miR-4791	FTO	fat mass and obesity associated
Details	28	73	hsa-miR-3201	FTO	fat mass and obesity associated
Details	29	73	hsa-miR-583	FTO	fat mass and obesity associated
Details	30	71	hsa-miR-4455	FTO	fat mass and obesity associated
Details	31	70	hsa-miR-7851-3p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	32	70	hsa-miR-5683	FTO	fat mass and obesity associated
Details	33	69	hsa-miR-548az-3p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	34	69	hsa-miR-548ar-3p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	35	69	hsa-miR-548f-3p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	36	69	hsa-miR-548e-3p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	37	69	hsa-miR-548a-3p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	38	68	hsa-miR-765	FTO	fat mass and obesity associated
Details	39	67	hsa-miR-664b-5p	FTO	fat mass and obesity associated

Details	40	66	hsa-miR-4663	FTO	fat mass and obesity associated
Details	41	66	hsa-miR-4486	FTO	fat mass and obesity associated
Details	42	65	hsa-miR-3916	FTO	fat mass and obesity associated
Details	43	65	hsa-miR-6859-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	44	65	hsa-miR-3125	FTO	fat mass and obesity associated
Details	45	64	hsa-miR-383-3p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	46	63	hsa-miR-616-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	47	63	hsa-miR-373-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	48	63	hsa-miR-371b-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	49	62	hsa-miR-4713-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	50	62	hsa-miR-6728-3p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	51	61	hsa-miR-6762-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	52	61	hsa-miR-6845-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	53	61	hsa-miR-323b-3p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	54	60	hsa-miR-4738-3p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	55	60	hsa-miR-5092	FTO	fat mass and obesity associated
Details	56	59	hsa-miR-6761-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	57	58	hsa-miR-6731-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	58	58	hsa-miR-8085	FTO	fat mass and obesity associated
Details	59	58	hsa-miR-4649-3p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	60	57	hsa-miR-1273g-3p	FTO	fat mass and obesity associated

Details	61	56	hsa-miR-558	FTO	fat mass and obesity associated
Details	62	55	hsa-miR-593-3p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	63	55	hsa-miR-8080	FTO	fat mass and obesity associated
Details	64	55	hsa-miR-6870-3p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	65	54	hsa-miR-4306	FTO	fat mass and obesity associated
Details	66	54	hsa-miR-940	FTO	fat mass and obesity associated
Details	67	54	hsa-miR-6857-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	68	54	hsa-miR-6808-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	69	54	hsa-miR-6893-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	70	54	hsa-miR-3168	FTO	fat mass and obesity associated
Details	71	52	hsa-miR-449b-3p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	72	52	hsa-miR-4485-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	73	51	hsa-miR-4775	FTO	fat mass and obesity associated
Details	74	51	hsa-miR-365a-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	75	51	hsa-miR-5681a	FTO	fat mass and obesity associated
Details	76	51	hsa-miR-365b-5p	FTO	fat mass and obesity associated
Details	77	50	hsa-miR-4279	FTO	fat mass and obesity associated
Details	78	50	hsa-miR-7150	FTO	fat mass and obesity associated

Tabela 7: Lista de miRs gerados pelo programa mirDB com possível afinidade pela região 3' UTR do gene FTO.

8.3. Apêndice C - Valores obtidos de cada amostra na PCR para o gene RPL39

Results Table

Well	Sample	Target	Task	Ct	ΔCt	Tm1	Tm2	Tm3
A1	224_1	RPL39	UNKNOWN	22.5384		80.5002		
A2	224_2	RPL39	UNKNOWN	22.5393		80.5002		
A3	235_1	RPL39	UNKNOWN	23.5635		80.4999		
A4	235_2	RPL39	UNKNOWN	23.4745		80.4999		
A5	198_1	RPL39	UNKNOWN	25.5937		80.4966		
A6	198_2	RPL39	UNKNOWN	25.0769		80.4966		
A7	204_1	RPL39	UNKNOWN	22.2987		80.3545		
A8	204_2	RPL39	UNKNOWN	22.3381		80.3545		
A9	215_1	RPL39	UNKNOWN	22.3331		80.6252		
A10	215_2	RPL39	UNKNOWN	22.3495		80.4759		
A11	205_1	RPL39	UNKNOWN	25.2096		80.6288		
A12	205_2	RPL39	UNKNOWN	24.7165		80.4795		
B1	206_1	RPL39	UNKNOWN	30.2404		80.6493		
B2	206_2	RPL39	UNKNOWN	29.3936		80.5002		
B3	226_1	RPL39	UNKNOWN	26.5343		80.649		
B4	226_2	RPL39	UNKNOWN	26.9889		80.3507		
B5	229_1	RPL39	UNKNOWN	24.7026		80.4966		
B6	229_2	RPL39	UNKNOWN	24.605		80.4966		
B7	232_1	RPL39	UNKNOWN	23.9662		80.5036		
B8	232_2	RPL39	UNKNOWN	23.9925		80.3545		
B9	211_1	RPL39	UNKNOWN	24.3901		80.4759		
B10	211_2	RPL39	UNKNOWN	24.4046		80.4759		
B11	201_1	RPL39	UNKNOWN	21.8477		80.4795		
B12	201_2	RPL39	UNKNOWN	21.8708		80.4795		
C1	225_1	RPL39	UNKNOWN	20.1739		80.5002		
C2	225_2	RPL39	UNKNOWN	20.4091		80.3511		
C3	222_1	RPL39	UNKNOWN	22.403		80.2016		
C4	222_2	RPL39	UNKNOWN	22.0309		80.2016		
C5	230_1	RPL39	UNKNOWN	24.2279		80.4966		
C6	230_2	RPL39	UNKNOWN	24.1183		80.3475		

Figura 10: Valores obtidos no experimento de PCR para a amplificação do gene RPL39 (controle endógeno). Apresentamos de forma parcial os resultados, assim como não apresentamos os valores obtidos para o gene FTO, pois se trata de um trabalho ainda não publicado.

8.4. Apêndice D – Curva de *melting* para o primer do gene FTO

Figura 11: A curva de melting é essencial para identificar a formação de um único produto específico ou se outros inespecíficos foram formados. O aparecimento de um único pico sugere a amplificação de um único produto e o surgimento de outros picos sugere a amplificação de outros produtos inespecíficos, como também a dimerização dos primers.

8.5. Apêndice E – Curva de *melting* do gene RPL39

Figura 12: A curva de melting é essencial para identificar a formação de um único produto específico ou outros inespecíficos foram formados. O aparecimento de um único pico sugere a amplificação de um único produto e o surgimento de outros picos sugere a amplificação de outros produtos inespecíficos, como também a dimerização dos primers.

8.6. Apêndice F - Valores obtidos de cada amostra na PCR para o hsa-miRNA-103

Results Table

Well	Sample	Target	Task	Ct	ΔC_t
A1	230	mir_103	UNKNOWN	30.7198	
A2	230	mir_103	UNKNOWN	30.6738	
A3	226	mir_103	UNKNOWN	Undetermined	
A4	226	mir_103	UNKNOWN	Undetermined	
A5	232	mir_103	UNKNOWN	29.4333	
A6	232	mir_103	UNKNOWN	29.5772	
A7	201	mir_103	UNKNOWN	28.4615	
A8	201	mir_103	UNKNOWN	28.6006	
A9	225	mir_103	UNKNOWN	28.6168	
A10	225	mir_103	UNKNOWN	28.7411	
A11	c3	mir_103	UNKNOWN	28.9069	
A12	c3	mir_103	UNKNOWN	29.0423	
B1	211	mir_103	UNKNOWN	32.1736	
B2	211	mir_103	UNKNOWN	32.2253	
B3	198	mir_103	UNKNOWN	30.3122	
B4	198	mir_103	UNKNOWN	30.3855	
B5	222	mir_103	UNKNOWN	30.8275	
B6	222	mir_103	UNKNOWN	30.8478	
B7	205	mir_103	UNKNOWN	29.2155	
B8	205	mir_103	UNKNOWN	29.4809	
B9	204	mir_103	UNKNOWN	30.047	
B10	204	mir_103	UNKNOWN	29.9733	
B11	c1	mir_103	UNKNOWN	30.0387	
B12	c1	mir_103	UNKNOWN	30.2813	
C1	224	mir_103	UNKNOWN	32.0312	
C2	224	mir_103	UNKNOWN	31.9898	
C3	c2	mir_103	UNKNOWN	29.7203	
C4	c2	mir_103	UNKNOWN	29.8548	
C5	234	mir_103	UNKNOWN	30.1411	
C6	234	mir_103	UNKNOWN	30.1511	

Figura 13: Valores obtidos no experimento de PCR para a amplificação do hsa-miR-103 (controle endógeno). Apresentamos de forma parcial os resultados, assim como não apresentamos os valores obtidos para o hsa-miR-150-5p, pois se trata de um trabalho ainda não publicado.

8.7. Apêndice G – Produções durante o mestrado

MORAES, V. N.; Bueno Junior. Lack of association between ACE ID genetic polymorphism and diabetes or hypertension in Brazilians aged from 50 to 70 years old. *MEDICINA (RIBEIRAO PRETO. ONLINE)*, v. 50, p. 109-113, 2017.

MORAES, V. N.; TRAPE, A. A.; FERREZIN, L.; GONCALVES, T. C. P.; MONTEIRO, C. P.; Bueno Junior. Association of ACE ID and ACTN3 C>T genetic polymorphisms with response to a multicomponent training program in physical performance in women from 50 to 70 years. *SCIENCE & SPORTS*, 2018.

TRAPE, A. A.; RODRIGUES, J. A. L., FERRARI, G., Lizzi, E. A. S.; MORAES, V.N., et al. Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) polymorphisms can influence the effect of multicomponent training on blood pressure, nitrite concentration and physical fitness in prehypertensive and hypertensive older adult women. (Submetido para Plos One).

ALMEIDA, M. L., CORRÊA, M., F., RODRIGUES, J. A. L., MORAES, V.N., Bueno Junior. Associação de capacidades físicas e funcionais de homens e mulheres de 45 a 65 anos fisicamente ativos. (Em revisão para ressubmissão).

RODRIGUES, J. A. L., FERRARI, G., TRAPE, A. A.; MORAES, V.N., GONCALVES, T. C. P.; TAVARES, S. S., Bueno Junior. Influence of B-2 adrenergic receptors haplotypes on cardiac autonomic function: Effects of high intensity and moderate continuous training in overweight/obese individuals. (Em revisão para submissão).

MORAES, V. N.; TRAPE, A. A.; FERREZIN, L.; GONCALVES, T. C. P.; MONTEIRO, C. P.; Bueno Junior. Association among genetic polymorphisms in ace and ACTN3 genes and a multicomponent training program in older women. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio)

TRAPE, A. A.; FERREZIN, L.; GONCALVES, T. C. P.; FERRARI, G.; MORAES, V. N.; BOUZA, B.; MAGALLANES, C.; Bueno Junior. Polimorfismos da óxido

nítrico sintase endotelial (nos3) podem influenciar o efeito do treino multicomponente na pressão arterial, concentração de nitrito e aptidão física em mulheres normotensas e hipertensas. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

TRAPE, A. A.; SILVA, E. A. S ; FERRARI, G.; MORAES, V. N.; GONCALVES, T. C. P.; ALMEIDA, M. L.; PERTICARRARI, A. B.; JACOMINI, A. M; ZAGO, A. S; Bueno Junior . Programa de exercícios físicos multicomponentes promove melhoras nos parâmetros de saúde em mulheres independente do nível habitual de atividade física. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

RODRIGUES, J. A. L., FERRARI, G., GONCALVES, T. C. P; MORAES, V.N., TRAPE, A. A.; TAVARES, S. S., Bueno Junior. Associação de variantes genéticas com respostas a diferentes treinamentos intervalados de alta intensidade em indivíduos com sobrepeso/obesidade. (Apresentação de Trabalho/Congresso).