UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE
DEPARTAMENTO DE BIODINÂMICA DO MOVIMENTO DO CORPO HUMANO

**Potencial Terapêutico da inibição do microRNA-34c-3p: Desvendando
Reguladores Moleculares através do Treinamento Físico Aeróbio**

CLARA NÓBREGA

**SÃO PAULO
2019**

CLARA NÓBREGA

**Potencial Terapêutico da inibição do microRNA-34c-3p: Desvendando
Reguladores Moleculares através do Treinamento Físico Aeróbio**

Dissertação entregue à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Estudos Biotinômicos da Educação Física e Esporte.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Edilamar Menezes de Oliveira.

SÃO PAULO

2019

Catálogo da Publicação
Serviço de Biblioteca
Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo

Nóbrega, Clara

Potencial Terapêutico da inibição do microRNA-34c-3p: Desvendando Reguladores Moleculares através do Treinamento Físico Aeróbico / Clara Nóbrega. -- São Paulo: [s.n.], 2019.
129p.

Dissertação (Mestrado) - Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira

1. miRNA-34c-3p 2. Treinamento Físico 3. Hipertrofia Cardíaca I.
Título.

NÓBREGA, Clara

Potencial Terapêutico da inibição do microRNA-34c-3p: Desvendando Reguladores Moleculares através do Treinamento Físico Aeróbio

Dissertação entregue à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Estudos Biodinâmicos da Educação Física e Esporte.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Edilamar Menezes de Oliveira.

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof.(a) Dr(a) _____	Instituição _____
Julgamento _____	Assinatura _____

Prof.(a) Dr(a) _____	Instituição _____
Julgamento _____	Assinatura _____

Prof.(a) Dr(a) _____	Instituição _____
Julgamento _____	Assinatura _____

*À Nicole, minha irmã,
por transformar ausência e saudade
em amor e entusiasmo pela Ciência.*

O presente trabalho foi desenvolvido com o apoio das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Processo Nº 133753/2016-6, no período entre maio de 2016 e março de 2017;

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – em convênio com a CAPES

Processo Nº 2016/14848-0, no período entre abril de 2017 e abril de 2018.

Agradecimentos

O caminho a ser percorrido ainda é longo, mas mais árduo seria se não houvessem tantas pessoas a agradecer.

À minha mãe, minha super-heroína e exemplo diário de tudo o que admiro, pelo apoio constante e incondicional. Obrigada, mainha, pela firmeza, doçura e precisão na minha educação e de meus irmãos, pela liberdade em sonharmos os nossos próprios sonhos, por estar na nossa retaguarda com atenção, por ser a nossa equipe. Obrigada por tudo que abdicou em prol de nos proporcionar as melhores experiências e oportunidades, permitindo que eu tivesse a sorte de escolher e reinventar o meu próprio destino.

Aos meus irmãos Dija, Nicole e Dadá, por me impulsionarem, fazendo com que, através do trabalho e dedicação aos estudos que culminam nesse trabalho, eu pudesse justificar a saudade que sinto de vocês. Vocês certamente são o que há de melhor em mim. À minha cunhada querida e amado Theo por trazerem ainda mais alegria e sentido a essa trupe!

Aos meus avós Ana Clara e José Carlos, constantes em pensamento e coração, que construíram uma base sólida para que essa família pudesse florescer. Obrigada pelo carinho, pela torcida, e por tentarem sempre extrair o que há de melhor em minhas presepadas.

À Marcos Rinaldi, por ser o irmão de vida e companheiro de alma, por não desistir da nossa amizade, mesmo sabendo que eu o troco constantemente pelo laboratório. Obrigada por não só apoiar as minhas loucuras, mas participar de todas elas, inclusive através de ilustrações que permeiam esse trabalho. Utilizo-me ainda desse sentimento para agradecer a todos os grandes amigos e amores que a vida me deu.

À Jana, Gabriel, Mikinha, Pergs, Aimee, Aninha, Nath e todos os amigos que São Paulo carinhosamente me cedeu, por todos os sorrisos, pelas cervejas e rodízios que alimentaram o coração e alma nos momentos mais difíceis. Obrigada por toda a parceria, pelos finais de semana juntos no laboratório. Vocês são porto seguro, braços que comemoram minhas vitórias, ombros que enxugaram minhas lágrimas, escudos que lutaram minhas batalhas, bocas que sorriram o meu riso.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício, e aos das bancadas vizinhas, em especial Ney Robson, pela parceria e

paciência no biotério, Luciano Lopes e Noemy Pereira pela incansável ajuda com os animais, Glorinha Mota pelos protocolos precisos e abraços de sempre, e Gabriel Tobias pela companhia nos finais de semana de trabalho, e nas filosofadas de vida nos cafés.

Aos funcionários da Escola de Educação Física e Esporte da USP, que com sua dedicação e empenho facilitam a vida de todos os que por essa Escola passam. Vocês, mais do que conhecimento, me deram asas; mais do que colegas de trabalho, me deram um time; mais do que abrigo, me deram coração.

Ao Prof. Edison de Jesus Manoel, por sua estimada contribuição em minha formação científico-acadêmica, por impulsionar meu desejo pelo conhecimento. Ao Prof. Flávio Henrique Bastos por ser o exemplo de docente que quero seguir, pela amizade, pelas reflexões e dedicação aos alunos. Por ser uma inspiração. Me valho dessa perspectiva para agradecer aos demais professores dessa estimada Escola pela recorrente oportunidade de crescimento e aprendizagem.

À minha mãe científica e orientadora, a Prof.^a Edilamar Menezes de Oliveira, pela oportunidade dada ao me receber no Laboratório, pela dedicação para com o meu processo de aprendizagem, pelo entusiasmo a cada ensaio feito, mas principalmente pela paciência em lidar com meus anseios, angústias e até decepções nessa caminhada científica. Sou grata por tê-la como exemplo a seguir em vários aspectos. Palavras jamais alcançarão a magnitude da importância que a senhora tem em minha vida. Muito obrigada!

Digo: o real não está na saída nem na chegada: ele
se dispõe para a gente é no meio da travessia!

(Guimarães Rosa)

Resumo

NÓBREGA, C. **Potencial Terapêutico da inibição do microRNA-34c-3p: Desvendando Reguladores Moleculares através do Treinamento Físico Aeróbico.** 2019. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2019.

Doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no Brasil. Em contraste a esse cenário, o treinamento físico aeróbico (TFA) figura como importante ferramenta de combate a esse quadro, atuando, dentre diversos mecanismos, na expressão de microRNAs (miRNA) e na hipertrofia cardíaca (HC). Nesse sentido, seria o TFA capaz de reduzir expressão do miR-34c-3p em cardiopatologias, gerando melhora aos danos causados? Na tentativa de elucidar essa lacuna, ratos Wistar machos (2 meses) passaram por oclusão da coronária gerando infarto do miocárdio (IMS; IMT) ou indução de diabetes tipo I por STZ (DS;DT: 45mg/kg). Após a verificação do dano, estes foram submetidos a TFA (10 sem), e os ventrículos esquerdos (VE) foram dissecados a posteriori. Ao analisar a expressão gênica por RT-PCR, o TFA diminuiu (39%; $p<0,02$) a expressão do miRNA-34c-3p no VE de IMT vs. IMS. Em consonância, houve diminuição (27%; $p<0,04$) do miRNA em DT vs. DS. Investigando o potencial terapêutico dessa inibição, ao proceder análise in vitro em cultura primária de cardiomiócitos tratados com inibidor do miRNA (amiR-34c-3p), houve diminuição de sua expressão em 71% (50nM; $p<0,01$) vs. grupo controle (C), enquanto houve aumento de 41000% (50nM; $p<0,01$) entre o superexpressor (mmiR) e C. Analisando os marcadores de HC patológica entre amiR e C, verificou-se redução na α -actina esquelética (6,1%; $p<0,02$), aumento no ANF (84,4%; $p<0,05$) e redução na β -MHC (66%; $p<0,007$), demonstrando HC fisiológica em cardiomiócitos tratados com amiR. Buscando alvos do miR-34c-3p responsáveis por essas alterações, analisou-se o eIF4E, último fator iniciador de tradução ativado por via não canônica da PI3K-AKT-mTOR. Sua direta ativação pode representar importante avanço na busca por terapias que induzam a HC fisiológica. O amiR aumentou o eIF4E (64%; $p<0,003$), com validação por diminuição da atividade da luciferase (48%; $p<0,02$) através de ensaio com vetor 3'UTR do gene e miR-34c-3p. Outro alvo predito analisado, o KLF11, tem homologia com gene da insulina e pode estar relacionado com melhora metabólica do VE. O tratamento com amiR aumentou (192%; $p<0,006$) a expressão gênica do

KLF11, validado com redução de 55% na atividade da luciferase, e aumento da captação de glicose (13%; $p<0,04$). Com os dados expostos, o TFA foi eficiente em inibir a expressão do miR-34c-3p em VE de animais cardiopatas que, atuando em seus alvos agora validados, foi capaz de promover HC fisiológica e melhora metabólica em cardiomiócitos. Considerando os efeitos cardioprotetores da inibição desse miRNA, vislumbra-se o potencial terapêutico dessa inibição em paciente na perspectiva de atenuação de prejuízos causados por cardiopatias.

Palavras-chave: miRNA-34c-3p; treinamento físico; hipertrofia cardíaca; doenças cardiovasculares.

Abstract

NÓBREGA, C. **Therapeutic Potential of the inhibition of microRNA-34c-3p: Unravelling Molecular Regulators through Aerobic Exercise Training.** 2019. 124 f. Thesis (Master of Science) – School of Physical Education and Sport, University of Sao Paulo, São Paulo. 2019.

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in Brazil. In contrast to this scenario, aerobic exercise training (AET) is an important tool to combat this condition, acting, among several mechanisms, on the expression of microRNAs (miRNA) and cardiac hypertrophy (CH). In this sense, would AET be able to reduce expression of miR-34c-3p in cardiac pathologies, generating improvement to the damages caused by them? In an attempt to elucidate this knowledge gap, male Wistar rats (2 months) underwent coronary occlusion, causing myocardial infarction (IMS; IMT) or induction of type I diabetes by STZ (DS: DT: 45mg kg). After proof that cardiac damage was caused, they were submitted to AET (10 wk), and left ventricles (LV) were dissected post mortem. Analyzing gene expression by RT-PCR, AET decreased (39%; $p < 0.02$) miRNA-34c-3p expression in the LV of IMT vs. IMS. In agreement, there was a decrease (27%; $p < 0.04$) of the miRNA in DT vs. DS. Investigating the therapeutic potential of this inhibition, through in vitro analysis in primary culture of neonatal rat cardiomyocytes treated with miRNA inhibitor (amiR-34c-3p), expression of miRNA-34c-3p was decreased in 71% (50nM; $p < 0.01$) vs. (C), whereas there was an increase of 41000% (50nM; $p < 0.01$) between the superexpressor (mmiR) and C. Analyzing the pathologic HC markers between amiR and C, there was a reduction in skeletal α -actin ($P < 0.05$), an increase in ANF (84.4%, $p < 0.05$) and reduction in β -MHC (66%; $p < 0.007$), demonstrating physiological HC in cardiomyocytes treated with amiR. Searching for miRNA-34c-3p targets responsible for these changes, eIF4E, the last non-canonically activated translation initiator of PI3K-AKT-mTOR, was analyzed. Its direct activation may represent an important advance in the search for therapies that induce physiological CH. The amiR increased eIF4E expression (64%, $p < 0.003$), with validation for decreased luciferase activity (48%; $p < 0.02$) by assaying 3'UTR vector of the gene and miR-34c-3p. Another predicted target analyzed, KLF11, has homology with insulin gene and may be related to LV metabolic improvement. The treatment with amiR increased KLF 11 gene expression (192%; $p < 0.006$), with a 55% reduction in

luciferase activity and an increase in glucose uptake (13%; $p < 0.04$). With the data presented, AET was efficient in inhibiting the expression of miRNA-34c-3p in LV of cardiopathic animals that, acting on their now validated targets, was able to promote physiological CH and metabolic improvement in cardiomyocytes. Considering the cardioprotective effects of inhibition of this miRNA, we can speculate a therapeutic potential of the inhibition of miR-34c-3p in patients in prospect of mitigating the damage caused by cardiopathies.

Palavras-chave: miRNA-34c-3p; exercise training; cardiac hypertrophy; cardiovascular diseases.

Lista de Figuras

Figura 1	Mecanismos de atuação da estreptozotocina.....	28
Figura 2	Mecanismo de ativação do eIF4E.....	32
Figura 3	Biossíntese dos microRNAs.....	37
Figura 4	Validação do KLF11 como gene alvo do microRNA-34c-3p.....	39
Figura 5	Esquema ilustrativo do processo de extração de cardiomiócitos.....	40
Figura 6	Esquema ilustrativo do Gradiente de Percoll para separação de cardiomiócitos e demais células do miocárdio.....	41
Figura 7	Protocolo de Transfecção com Oligofectamine™.....	43
Figura 8	Protocolo de Transfecção com Lipofectamine RNAiMAX™.....	44
Figura 9	Análise da integridade de RNA total de cardiomiócitos por eletroforese em gel de agarose.....	45
Figura 10	Esquema do plasmídeo pLS_eIF4E, desenhado para validação do eIF4E como gene alvo do miRNA-34c-3p.....	50
Figura 11	Desenho experimental do ensaio do gene repórter da luciferase para a validação do eIF4E como alvo do miRNA-34c-3p.....	51
Figura 12	Placa branca específica para leitura de ensaios de luminescência.....	53
Figura 13	Placas de LB e Agar, contendo ampicilina a concentração de 1:1000, para seleção de bactérias transformadas com os plasmídeos de interesse.....	54
Figura 14	Desenho experimental do protocolo de Treinamento Físico dos animais.....	58
Figura 15	Análise da integridade de RNA total de VE por eletroforese em gel de agarose.....	62
Figura 16	Relação entre as diferentes concentrações do amiR-34c-3p ou mmiR-34c-3p transfectados em cardiomiócitos, analisado por RT-PCR.....	65
Figura 17	Expressão do RNA mensageiro do eIF4E e genes correlatos em cardiomiócitos tratados com amiR-34c-3p e mmiR-34c-3p, ambos a concentração de 50nM.....	67
Figura 18	Validação do eIF4E como gene alvo do microRNA-34c-3p.....	68
Figura 19	Imunofluorescência (IF) de cardiomiócitos tratados com amiR-34c-3p ou mmiR-34c-3p.....	69
Figura 20	Expressão de genes marcadores de hipertrofia cardíaca patológica tratados com amiR-34c-3p e mmiR-34c-3p, ambos a concentração de 50nM.....	71
Figura 21	Expressão gênica do eIF4E e genes marcadores de hipertrofia cardíaca patológica tratados com siRNA para o eIF4E, bem como amiR-34c-3p e mmiR-34c-3p, ambos a concentração de 50nM.....	73
Figura 22	Expressão do miRNA-34c-3p em cardiomiócitos tratados com siRNA para o gene eIF4E.....	74

Figura 23	Expressão de genes correlacionados ao KLF11 em cardiomiócitos tratados com amiR-34c-3p e mmiR-34c-3p, ambos a concentração de 50nM.....	76
Figura 24	Quantificação da glicose, no meio de cultura celular, após 48 horas da transfecção, por ACCU-CHEK Performa.....	77
Figura 25	Expressão gênica do KLF11 e genes marcadores de hipertrofia cardíaca patológica tratados com siRNA para o KLF11, bem como amiR-34c-3p e mmiR-34c-3p, ambos a concentração de 50nM.....	78
Figura 26	Expressão do miRNA-34c-3p em cardiomiócitos tratados com siRNA para o gene KLF11.....	79
Figura 27	Peso corporal dos animais.....	81
Figura 28	Glicemia medida através de aparelho ACCU-CHEK Performa.....	82
Figura 29	Registros adquiridos a partir de permanência de 24 horas em gaiola metabólica..	84
Figura 30	Glicemia e lactato medida através do Analisador Bioquímico Automático Labmax 240, no soro dos animais pós protocolo de TFA.....	85
Figura 31	Colesterol HDL, LDL e Total e Triglicérides medidos através do Analisador Bioquímico Automático Labmax 240, no soro dos animais pós protocolo de TFA.	86
Figura 32	Ureia, Creatinina e Ácido Úrico medidos através do Analisador Bioquímico Automático Labmax 240, no soro dos animais pós protocolo de TFA.....	87
Figura 33	Análise dos parâmetros hemodinâmicos dos animais pós protocolo de TFA.....	89
Figura 34	Teste de esforço físico máximo. Distância Percorrida (A), Tempo (B) e Velocidade (C) Pré e Pós TFA.....	90
Figura 35	Atividade da enzima citrato sintase no ventrículo esquerdo representada em valores de nmol. min ⁻¹ . mg de proteína ⁻¹	91
Figura 36	Diâmetro de cardiomiócitos analisados por cortes histológicos corados através de técnica HE.....	92
Figura 37	Peso da musculatura de 3 segmentos do tecido cardíaco.....	92
Figura 38	Peso da musculatura esquelética.....	93
Figura 39	Peso de vísceras.....	94
Figura 40	Expressão de marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca por RT-PCR.....	95
Figura 41	Expressão de marcadores de fibrose cardíaca por RT-PCR. Expressão gênica de colágeno 1A1 e 3A1 (COL1A1 e COL3A1), bem como de metaloproteinase do tipo 2 (MMP2).....	96
Figura 42	Expressão do miRNA-34c-3p em VE por RT-PCR.....	97
Figura 43	Expressão de genes eIF4E e correlatos por RT-PCR, em VE.....	97
Figura 44	Expressão de genes da via AKT-mTOR de hipertrofia cardíaca por RT-PCR, em VE.....	98
Figura 45	Expressão de genes KLF11 e correlatos por RT-PCR, em VE.....	99
Figura 46	Expressão gênica do gene eIF4E em VE dos animais controles sham e infartados, diabéticos sham e infartados, e animais que sofreram com dieta hiperlipídica sham e infartados, através da técnica de RT-PCR.....	102

Figura 47	Expressão gênica do gene eIF4E em VE dos animais controles sham e infartados, diabéticos sham e infartados, e animais que sofreram com dieta hiperlipídica sham e infartados, através da técnica de RT– PCR.....	103
Figura 48	Expressão gênica do gene KLF11 em VE dos animais controles sham e infartados, diabéticos sham e infartados, e animais que sofreram com dieta hiperlipídica sham e infartados, através da técnica de RT– PCR.....	103
Figura 49	Expressão gênica do miR-34c-3p em Ve dos animais sham sedentário e treinado, e infartados sedentário e treinado, através da técnica de RT – PCR.....	104
Figura 50	Expressão gênica dos genes EIF4E e eIF4BP1 em VE dos animais sham sedentário e treinado, e infartados sedentário e treinado, através da técnica de RT– PCR.....	105
Figura 51	Expressão gênica dos KLF11 e Glut-4, em VE dos animais sham sedentário e treinado, e infartados sedentário e treinado, através da técnica de RT– PCR.....	106
Figura 52	Piloto 1. Peso corporal e Glicemia dos animais da semana de aplicação da STZ até o final do protocolo, com 16 semanas, ou seja, 6 semanas a mais que o protocolo de TFA de natação proposto nesse projeto.....	117
Figura 53	Piloto 2. Peso corporal dos animais da semana de aplicação da STZ até o final do protocolo, com 11 semanas, ou seja, 1 semana a mais que o protocolo de TFA de natação proposto nesse projeto.....	119
Figura 54	Piloto 2. Peso corporal dos animais da semana de aplicação da STZ até o final do protocolo, com 11 semanas, ou seja, 1 semana a mais que o protocolo de TFA de natação proposto nesse projeto.....	120
Figura 55	Piloto 2. Dados obtidos em gaiola metabólica.....	121

Lista de Abreviaturas e Siglas

α -MCP	Alfa Miosina de Cadeia Pesada
β -MCP	Beta Miosina de Cadeia Pesada
AKT	PKB, proteína quinase B
amiR	Inibidor do microRNA
ANF	Fator natriurético atrial
cDNA	DNA complementar
CO ₂	Dióxido de carbono
COL1A1	Colágeno tipo I alfa 1
COL3A1	Colágeno tipo III alfa 1
CT	<i>Cycle Threshold</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eIF4BP1	<i>Eukaryotic initiation fator 4E binding protein 1</i>
eIF4E	<i>Eukaryotic initiation fator 4E</i>
eIF4G	<i>Eukaryotic initiation fator 4G</i>
FC	Frequência cardíaca
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
Glut-4	Transportador de glicose tipo
GTP	Guanosina trifosfato
HC	Hipertrofia cardíaca
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IRS1	Substrato do receptor de insulina 1
IRS2	Substrato do receptor de insulina 2
KLF11	<i>Kruppel-Like Factor 11</i>
miRNA	microRNA
mmHg	Milímetros de mercúrio
mmiR	Superexpressor do microRNA
MMP2	Metaloproteinase 2
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>

NhE1	Enzima de restrição derivada de <i>Neisseria mucosa heidelbergensis</i>
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
NRCM	<i>Neonatal Rat Cardiomyocyte</i>
PA	Pressão arterial
PDK	Piruvato desidrogenase quinase
PIK3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PIP	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína quinase A
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RISC	<i>RNA-induced silence complex</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RTK	Receptor de tirosina quinase
siRNA	<i>Small interference RNA</i>
STZ	Estreptozotocina
TFA	Treinamento físico aeróbio
TGF- β	Fator de transformação do crescimento do tipo beta
TNF- α	Fator de necrose Tumoral do tipo alfa
UTR	Região não traduzida
VE	Ventrículo esquerdo
Xho1	Enzima de restrição derivada de <i>Xanthomonas holcicola</i>

Sumário

1	Introdução.....	22
2	Objetivos.....	24
2.1	Objetivo geral	24
2.2	Objetivos específicos	24
3	Fundamentação Teórica.....	26
3.1	Diabetes <i>Mellitus</i>	26
3.1.1	Modelo Animal	27
3.2	Treinamento Físico Aeróbio e Diabetes <i>Mellitus</i>	28
3.2.1	Treinamento Físico Aeróbio e Coração	29
3.3	microRNAs	34
3.3.1	Biogênese e função dos microRNAs	35
3.3.1	microRNAs, TFA e Diabetes <i>Mellitus</i>	37
4	Metodologia	40
4.1	Ensaio <i>in vitro</i>	40
4.1.1	Cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos.....	40
4.1.2	Transfecção com antagomiR e miRmimic do microRNA-34c-3p.....	41
4.1.3	Determinação da concentração ideal do amiR-34c-3p e mmiR-34c-3p	43
4.1.4	Transfecção com RNA de interferência para os genes eIF4E e KLF11	43
4.1.5	Análise da expressão gênica do miRNA-34c-3p	45
4.1.5.1	Extração do RNA total	45
4.1.5.2	Síntese de cDNA para o miRNA-34c-3p.....	46
4.1.5.3	Reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR) para expressão do miRNA-34c-3p.....	46
4.1.6	Análise da expressão gênica de genes	46
4.1.6.1	Expressão dos genes	46
4.1.6.2	Síntese de cDNA para os genes estudados	47
4.1.6.3	Reação de RT-PCR para expressão do miRNA-34c-3p.....	47
4.1.6.4	Desenho dos <i>primers</i> estudados	47
4.1.7	Dosagem de Glicose.....	49

4.1.8	Ensaio de validação do eIF4E como gene alvo do miRNA-34c-3p	50
4.1.8.1	Transformação de bactéria termocompetente para amplificação dos plasmídeos	53
4.1.9	Imunofluorescência para verificar hipertrofia cardíaca	55
4.1.10	Dosagem de glicose e lactato	55
4.2	Ensaio <i>in vivo</i>	55
4.2.1	Animais experimentais	55
4.2.2	Escolha do modelo animal e indução a DM	56
4.2.3	Dosagem da glicose sanguínea	57
4.2.4	Protocolo de treinamento físico aeróbio de natação	57
4.2.5	Avaliação das respostas hemodinâmicas	58
4.2.6	Avaliação de tolerância ao esforço físico máximo	59
4.2.7	Gaiola Metabólica	59
4.2.8	Coleta das amostras	60
4.2.9	Avaliação bioquímica de sangue	60
4.2.10	Avaliação da atividade da enzima Citrato Sintase	61
4.2.11	Análise de expressão gênica do miRNA-34c-3p	62
4.2.11.1	Extração do RNA total	62
4.2.12	Análise da expressão gênica dos genes de interesse	63
4.2.12.1	Extração do RNA total	63
4.2.13	Avaliação histoquímica do VE	63
4.3	Análise de dados	63
5	Resultado	65
5.1	Resultados <i>in vitro</i>	65
5.1.1	Inibição do miRNA-34c-3p	65
5.1.2	eIF4E e genes correlatos	66
5.1.2.1	Validação do eIF4E como gene alvo do miRNA-34c-3p	68
5.1.3	Diâmetro dos cardiomiócitos	69
5.1.4	Marcadores de Hipertrofia Cardíaca	69
5.1.5	siRNA eIF4E	71
5.1.6	KLF11 e genes correlatos	75
5.1.7	Dosagem de Glicose	76
5.1.8	siRNA KLF11	77

5.2	Caracterização dos Animais submetidos ao Treinamento Físico Aeróbio e seus controles	79
5.2.1	Peso Corporal e Glicemia	79
5.2.2	Gaiola Metabólica	82
5.2.3	Parâmetros Bioquímicos	85
5.3	Marcadores de Treinamento	88
5.3.1	Parâmetros Hemodinâmicos	88
5.3.2	Teste de esforço físico máximo	89
5.3.3	Atividade da enzima Citrato Sintase	91
5.3.4	Diâmetro dos cardiomiócitos	91
5.3.5	Peso dos tecidos	92
5.3.6	Marcadores de Hipertrofia Cardíaca Patológica	94
5.4	microRNA-34c-3p e Hipertrofia Cardíaca	96
5.5	microRNA-34c-3p e Genes Metabólicos	98
6	Potencial Terapêutico da inibição do miRNA-34c-3p: Estudo 2.....	101
6.1	Animais Diabéticos e Infartados.....	101
6.2	Animais Infartados e submetidos a Treinamento Físico Aeróbio.....	103
7	Conclusões e Perspectivas.....	107
	Referências	110
	Apêndice A: Estudo Piloto do modelo de Diabetes por Estreptozotocina	116
A.	1 Caracterização do Modelo Experimental	116
	Relatório de Atividades.....	122
	• Participação em Reuniões Científicas	122
	• Cursos, Aulas e Palestras Ministrados	122
	• Programa de Aperfeiçoamento de Ensino na Pós-Graduação.....	123
	• Produção Acadêmica.....	123
	• Prêmios Científicos	124
	• Participação em Eventos Científicos com apresentação de trabalho..	125
	• Participação em Eventos Científicos sem apresentação de trabalho..	125
	• Treinamentos e habilitações	126
	• Vínculos e Filiações	126

•	Disciplinas Cursadas	127
---	----------------------------	-----

1 Introdução

Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença relacionada a alterações no metabolismo de glicose, envolvendo a produção, secreção e captação de insulina. Esta doença, que já possui *status* de epidemia, desencadeia uma série de outros distúrbios e problemas no paciente, como insuficiência renal, glaucoma, derrame cerebral, e especialmente doenças cardiovasculares, que são a principal causa de morte por DM (1).

Considerando a necessidade de descoberta e desenvolvimento de mecanismos capazes de reverter os quadros instaurados por essa doença, bem como por outras cardiopatias, o treinamento físico aeróbio (TFA) surgiu como uma estratégia não farmacológica de prevenção e tratamento frente aos estímulos patológicos causados pela DM. O TFA promove um controle da glicemia, aumento na sensibilidade a insulina, diminuição do peso corporal, e consequentemente de lipídios, melhora na função cardiovascular, promovendo a manutenção da pressão arterial (PA) (2,3).

Entretanto, os mecanismos intracelulares pelos quais o TFA estimula essas respostas ainda não estão elucidados, trazendo questionamentos acerca de uma nova classe de moléculas capazes de regular pós-transcricionalmente a expressão de seus genes alvos, os microRNAs (miRNA). Já é conhecido, porém, que estas pequenas sequências endógenas de RNA mensageiro têm sua expressão regulada pelo treinamento físico (4).

O miRNA-34c-3p apresentou uma expressão exacerbadamente diminuída no ventrículo esquerdo (VE) de animais Wistar saudáveis submetidos ao TFA. Além disso, em cultura de cardiomiócitos de ratos Wistar neonatos, a inibição do miRNA-34c-3p promoveu um brusco aumento da expressão do KLF11, e aumento na captação de glicose. É sabido que o KLF11 tem funções envolvidas com a regulação do crescimento celular via TGF- β , que o aumento de sua expressão é capaz de controlar o gene da insulina, e ainda tem sua expressão *down*-regulada na insuficiência cardíaca (5–7).

Baseado em dados obtidos durante iniciação científica, e acima mencionados, este trabalho tem como hipótese que o TFA é capaz de promover a inibição do miRNA-34c-3p no VE de ratos diabéticos, e que esta regulação pode desencadear respostas

na hipertrofia cardíaca fisiológica e, principalmente, na melhora metabólica deste tecido.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Esta dissertação teve como principais objetivos:

- 1) Verificar se o treinamento físico aeróbio é capaz de alterar negativamente a expressão do miRNA-34c-3p no ventrículo esquerdo de animais diabéticos do tipo I;
- 2) Se sim, investigar se é a inibição do miRNA-34c-3p em resposta ao TFA o mecanismo responsável pelo aumento de translocação de Glut-4 do citosol para a membrana celular frente ao estímulo do treinamento físico, mecanismo este independente à ação de insulina;
- 3) Investigar possível modulação gênica e remodelamento estrutural envolvido com o miRNA-34c-3p na diabetes do tipo I e os efeitos do TFA sobre esses fenótipos, no que tange o metabolismo oxidativo e a hipertrofia cardíaca.

No estudo 2, este projeto teve como objetivos:

- 1) Verificar se o miRNA-34c-3p tem sua expressão aumentada frente a diferentes estímulos patológicos no coração;
- 2) Investigar o potencial terapêutico do TFA frente aos estímulos patológicos, através da inibição do miRNA-34c-3p.

2.2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos, tem-se que:

- 1) Em cultura celular, avaliar se a inibição do miRNA-34c-3p com antagomiR promove:
 - Aumento na expressão gênica do eIF4E e do KLF11;
 - Modificações em genes envolvidos na via IGF-PI3K-AKT-mTOR;
 - Diminuição de marcadores de hipertrofia patológica (ANF, α -actina esquelética e β -MCP);

- Aumento do diâmetro de cardiomiócitos, revelando hipertrofia cardíaca;
 - Aumento da captação de glicose, demonstrando melhora no metabolismo celular;
 - Validação do eIF4E como gene alvo do miRNA-34c-3p, por ensaio de luciferase;
- 2) Em animal experimental, avaliar os efeitos do TFA em ratos diabéticos nos seguintes parâmetros:
- Evolução da massa corporal;
 - Comportamento da frequência cardíaca de repouso;
 - Alterações nos níveis glicêmicos;
 - Capacidade de realização de esforço físico máximo;
 - Capacidade oxidativa do ventrículo esquerdo;
 - Expressão do miRNA-34c-3p no ventrículo esquerdo;
 - Expressão de genes alvos do miRNA-34c-3p e outros genes correlacionados com este miRNA e a diabetes, através de expressão gênica;
 - Modulação dos níveis de glicose e lactato do tecido cardíaco;
 - Relação entre miRNA-34c-3p e as vias hipertróficas e de metabolismo oxidativo.

3 Fundamentação Teórica

3.1 Diabetes *Mellitus*

Diabetes *mellitus* é um grupo heterogêneo de doenças e distúrbios metabólicos primordialmente classificado pela hiperglicemia. Este quadro pode ser gerado por deficiência na secreção e/ou ação da insulina, ou ainda por destruição das células β -pancreáticas, as quais produzem este hormônio. De acordo com a American Diabetes Association (8), quando crônica, a hiperglicemia está associada com a disfunção e falência de órgãos como olhos, rins, nervos, vasos sanguíneos e coração.

Segundo a Federação Internacional de Diabetes (9), há, no mundo, cerca de 385 milhões de pessoas com DM, sendo estimado que até 2035 este número cresça para 592 milhões de humanos. Em 2014, a DM causou a morte de 4,9 milhões de pessoas, uma média alarmante de 1 morte a cada 7 segundos. No Brasil, este quadro não é diferente: figurando como o 4º país com maior prevalência desse distúrbio, estima-se que 11,9 milhões de brasileiros possuam DM. Considerando que o aumento dos casos de DM está diretamente relacionado à maior urbanização, ao aumento da obesidade e do sedentarismo (10), e ainda pela alta morbidade a ela relacionada, e por tratar-se de um fator de risco cardiovascular e cerebrovascular (11), a DM configura-se como um importante problema de saúde pública.

A Organização Mundial de Saúde (1) a DM é dividida em três principais classes clínicas: 1) DM tipo 1 (DM1), resultado da depleção ou destruição de células β -pancreáticas, geralmente relacionadas a processos autoimunes; 2) DM tipo 2 (DM2), resultado de complicações na ação e secreção de insulina; 3) DM gestacional (DMG), intolerância à glicose, em qualquer magnitude, diagnosticada durante a gestação.

Sendo uma doença metabólica, a DM está comumente associada a complicações crônicas no sistema do paciente tais quais: doenças micro e macrovasculares (aterosclerose e gangrena), neuropáticas, e cardiomiopáticas como insuficiência cardíaca e maior predisposição a infarto do miocárdio (12,13). Este último ponto da problemática envolvendo a DM, é a causa mais recorrente de mortalidade nos pacientes com DM, despertando especial atenção para este tópico.

Apesar de os mecanismos pelos quais a DM promove um aumento significativo nos riscos cardiovasculares não serem elucidados, algumas hipóteses surgiram. A primeira delas diz respeito à hipertrofia cardíaca concêntrica, quando há sobrecarga de pressão, levando a um espessamento da parede ventricular a partir do depósito de sarcômeros em paralelo, e comumente é associada a patologias (14,15). Outra causa bastante estabelecida é o aumento de fibrose intersticial (16). Entretanto, a principal causa molecular para esta predisposição a doenças cardiovasculares em pacientes com DM está envolvida com o metabolismo das células cardíacas. Scheuermann-Freestone e colaboradores (17) mostraram que a hiperglicemia decorrida da DM acaba por compensar negativamente a capacidade do miocárdio de captar glicose, provocando danos isquêmicos.

3.1.1 Modelo Animal

Tendo em vista a necessidade de melhor entender os mecanismos bioquímicos e moleculares alterados com a DM, e compreendendo as limitações metodológicas com o estudo em humanos, modelos animais têm sido amplamente estudados, como ratos geneticamente modificados e desenvolvem espontaneamente a DM, ou ainda aqueles que, com o uso de estreptozotocina (STZ) ou outros fármacos, tem a DM induzida, destruindo as células β -pancreáticas. Apesar de pouco elucidados, os principais mecanismos de atuação da STZ são: a metilação do DNA, levando a danos no DNA através da depleção dos estoques energético, resultando em necrose; a STZ atua como doadora de óxido nítrico (NO), atuando como alquilação do DNA, causando morte celular; ou ainda, através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que, ao causar um desbalanço oxidativo, inibe sinalização protetora ao DNA mitocondrial das células β -pancreáticas como ilustra a figura 1 (18–20). Sendo assim, a DM encontrada nestes animais assemelha-se àquela encontra em humanos com DM do tipo I (DM1).

Figura 1: Mecanismos de atuação da estreptozotocina. Ao ser reconhecida pelo transportador de glicose do tipo 2 (Glut-2) na membrana das células pancreáticas, a STZ atua principalmente em três mecanismos que levam a morte das células β -pancreáticas: metilando o DNA, causando um desbalanço energético; produzindo demasiadamente espécies reativas de oxigênio (ROS); e doando óxido nítrico (NO).

Quando submetidos a uma única dose de STZ (entre 25 e 50 mg/Kg) e não tratados com insulina, ratos apresentam alterações congruentes as vistas em humanos com DM1, como hiperglicemia, poliúria (21), bem como neuropatia e cardiomiopatias (3), mostrando-se um modelo animal interessante no que tange o estudo de parâmetros cardioprotetores.

3.2 Treinamento Físico Aeróbio e Diabetes *Mellitus*

Considerando que o sedentarismo e a inatividade física tem papel fundamental no aumento de fatores de risco cardiovascular e a maior prevalência de DM, e ainda ressaltando os efeitos benéficos tanto no sistema cardiovascular, quanto em parâmetros metabólicos, após sessões agudas e crônicas de exercício físico, tem-se levado em consideração, por parte da comunidade científica, a prescrição do treinamento físico como uma conduta não farmacológica para prevenção e tratamento de doenças como hipertensão arterial e de síndromes associadas à DM e a resistência à insulina (22,23).

Em humanos, o TFA mostrou-se capaz de melhorar o controle da glicemia e da sensibilidade à insulina, além de diminuir fatores de risco para doenças cardiovasculares, como mostrado na revisão de Marwick e colaboradores (24). Além desses achados, em animais experimentais, Mostarda e colaboradores (25) mostraram que o TFA foi capaz de normalizar a hipotensão arterial, a disfunção ventricular e a bradicardia em ratos diabéticos por STZ, levando a uma melhora na função do miocárdio.

Considerando que a resistência à insulina tem um papel fundamental no acometimento de doenças cardiovasculares, e que esses espectros são amplamente encontrados na DM, é importante frisar que o TFA é capaz de produzir efeitos positivos em fenótipos patológicos, já que este leva a uma melhora no metabolismo de lipídios e glicose, e ainda na maior eficiência de transporte de glicose para a musculatura esquelética e cardíaca, tanto por aumentar a sensibilidade da célula à insulina, quanto por estimular a translocação de Glut-4 mediada não somente pelo estímulo mecânico imposto às células, bem como na melhoria da função cardíaca, agindo como potente fator cardioprotetor por promover hipertrofia cardíaca (HC) fisiológica (2,26–29).

3.2.1 Treinamento Físico Aeróbio e Coração

No coração, o TFA tem como principal via de atuação a da fosfoinositídeo-3 quinase/proteína quinase b ou PI3K/AKT, estimulando não somente o aumento da biogênese ribossomal, e da síntese proteica, mas também a translocação de Glut-4 do citosol para a membrana celular, e ainda está relacionada a sobrevivência celular e a cardioproteção (30–32).

Estudos mostram de maneira bastante abrangente que o TFA, em oposição aos estímulos patológicos, promove uma diminuição na expressão de genes como β -MCP, ANF e α -actina esquelética (33,34). Assim, o TFA desencadeia uma HC fisiológica e simétrica, e as adaptações decorrentes desses estímulos variam de acordo com a natureza, intensidade e duração do exercício, ocorrendo modificações nas proporções dos diferentes tipos de proteínas estruturais do sarcômero, como por exemplo actina e miosina. Em resposta ao TFA, tem-se um aumento no comprimento das miofibrilas, quando há adição de sarcômeros em série, gerando uma HC

fisiológica excêntrica. Assim, estes aumentos são os responsáveis pela manutenção da tensão na parede ventricular em níveis fisiológicos (35).

É sabido que o aumento na síntese proteica desencadeada pelo TFA é dependente de sinalização extracelular, que desencadeia uma cascata de sinalização intracelular (segundo mensageiros), levando informação ao núcleo da célula, através dos terceiro e quarto mensageiros, que promovem interação com o DNA, ou seja, ativando replicação, manutenção e rearranjos deste DNA, induzindo a transcrição em RNA, e terminando com a síntese, processamento e regulação de proteínas, levando a uma reprogramação da atividade celular (36).

Os processos anteriormente citados são sequenciais, e podem ser regulados em diferentes pontos e, em resposta ao estímulo do TFA, potencializam a formação de novas unidades contráteis, resultando no aumento do volume dos cardiomiócitos, ou seja, na potencialização do trabalho do músculo cardíaco. É relevante salientar ainda, que a direção do crescimento celular não é controlada somente pelo processo de transcrição gênica, podendo assim sofrer controle pós-transcricional, como estabilidade do RNA, no próprio processo de tradução e estruturação da proteína (37).

É importante citar que, para iniciar a cascata de sinalização nas células cardíacas, que resultará na síntese proteica e consequente HC, tem-se que observar principalmente estímulos químicos e mecânicos sobre receptores de membrana. Agentes químicos como agonistas β -adrenérgicos, a angiotensina II, o TGF- β (fator de transformação do crescimento tipo β), a endotelina 1, e o IGF-1 (fator de crescimento semelhante a insulina) são conhecidos como potentes estimulantes da síntese proteica no miocárdio, sendo assim, estimulantes da HC (6,38).

Os sinais bioquímicos expressos a partir da sinalização extracelular são mediados por receptores, canais iônicos, e por proteínas ancoradas a membrana. Os receptores de membrana são ativados por seus respectivos agonistas, enquanto que as proteínas ancoradas são sensíveis ao estresse mecânico. Ao serem ativados, estes mediadores desencadeiam uma cascata de ativação intracelular que coordena a HC, alterando a expressão gênica e a velocidade de tradução ribossomal de proteínas, além da diminuição da degradação proteica no citosol.

Na HC induzida pelo TFA, a via de sinalização mais estudada e estabelecida é a do receptor de tirosina quinase (RTK), ao qual se ligam fatores de crescimento como o Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF) e o Fator de Crescimento semelhante a Insulina (IGF-1), fator este que será amplamente comentado neste

estudo, já que esta via de sinalização é de extrema importância para a regulação do ciclo de proliferação celular, para o crescimento da célula e sua sobrevivência, através da síntese proteica (31), uma vez que estudos demonstram que a inibição da via iniciada pelo IGF-1 impede a adaptação do cardiomiócito, enquanto que sua ativação induz a HC (32,35,39).

Ao ligar-se ao seu receptor (RTK – IGF-R), o IGF-1 ativa uma proteína lipídeo quinase do subgrupo $I\alpha$ da (PI3K), que possui uma subunidade p85 regulatória e uma subunidade catalítica p110 α , através da ativação dos substratos de receptor de insulina (IRS 1 e 2) (40). A expressão de uma forma ativa desta subunidade (p110 α) leva o cardiomiócito a HC fisiológica, com aumento no volume do miocárdio e a manutenção da função cardíaca; já em sua forma inativa, esta subunidade impede o desenvolvimento da HC (32,41).

Após ser ativada, a PI3K α fosforila o fosfatidil inositol difosfato (PIP2) da membrana plasmática, levando ao recrutamento da proteína quinase AKT (PKB), e seu ativador, a proteína quinase-1 dependente de fosfoinosítídeo-3 (PDK1). Ao ser recrutada, a proteína PDK1 fosforila a AKT, ativando-a. Vale ressaltar que, entre os três genes existentes para a AKT, apenas dois são superexpressos no coração, sendo eles a AKT1 e a AKT2.

Uma vez ativada, a AKT age sobre duas moléculas: glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β), inibindo-a, e a proteína quinase mTOR, aumentando a síntese protéica (42,43), sendo esta última o alvo de nossa análise.

Quando ativada, por sua vez, a mTOR é capaz de ativar as proteínas quinase S6 (S6K1 e S6K2), que apesar de aumentarem a biossíntese ribossomal, a tradução de proteínas, a progressão do ciclo celular e até mesmo a hipertrofia, estudos mostram que o corte gênico dessas proteínas não altera o crescimento muscular induzido por exercício (41). A mTOR ativada aciona também a liberação do complexo 4EBP1-eIF4E (fator de iniciação da tradução), fosforilando o primeiro fator mencionado (4EBP1), fato que libera o eIF4E, permitindo a ligação entre o eIF4E e o eIF4G (fator responsável por facilitar a ligação do ribossomo e sua passagem pela região 5' não traduzida do gene – UTR), como mencionado por Carrera (44) e Vary e colaboradores (45). Ou seja, ao ser ativada, a mTOR inibe a 4EBP1, fosforilando-a, e esta inibição promove a ativação do eIF4E, já que o complexo 4EBP1-eIF4E é desfeito. Após ser liberado, o eIF4E fica livre para ligar-se ao eIF4G, sendo este novo

complexo responsável pela sinalização ribossomal da síntese proteica, mecanismo ilustrado na figura 2.

O eIF4E é uma proteína pertencente à família dos fatores de iniciação da tradução (eIFs). Estudos recentes mostram a importância do entendimento da regulação dos ligantes a esse fator, já que, como visto anteriormente, é notada a relevância dessa via para a HC (46). Ou seja, o eIF4E mostra-se como um fator primordial para a síntese proteica gerando HC.

Figura 2: Mecanismo de ativação do eIF4E. Ao ser fosforilada, a mTOR fosforila inibindo a proteína 4E-BP1, promovendo o desacoplamento da eIF4E. Com isso, a eIF4E pode ligar-se a eIF4G que, juntamente com outras proteínas, formam o complexo eIF4F. Ao término da formação desse complexo há a sinalização ribossomal da síntese de proteínas.

Esse fator é ainda responsável por reconhecer e ligar-se ao resíduo 7-metilguanosina do mRNA, extremidade adjacente à região 5' não traduzida, prematuramente a iniciação da síntese protéica, além de facilitar a ligação do ribossomo, por induzir o desaparecimento das estruturas de mRNA secundários (36,46,47).

Apesar de já haver um amplo entendimento desses ativadores da HC, principalmente no que tange a HC fisiológica, pouco se tem esclarecido na literatura sobre reguladores negativos desta, e que podem ser fortes candidatos a verdadeiros bloqueadores de respostas a HC patológica (6). Além disso, é sabido que, somada à HC fisiológica, o TFA promove ganhos em estímulos bioquímicos capazes de melhorar a maquinaria oxidativa no miocárdio, via PI3K-AKT, estimulando não somente o aumento da biogênese ribossomal, e da síntese proteica, mas também a

translocação de Glut-4 do citosol para a membrana celular, e ainda está relacionada a sobrevivência celular e a cardioproteção (30,31,48,49).

Possíveis reguladores negativos da HC patológica, e que, em tecido saudável e submetido ao TFA podem estar relacionados à melhora metabólica do miocárdio são os fatores de transcrição de Krüppel-like (KLF), que possuem 3 domínios do tipo dedo de zinco em suas extremidades C-terminal, capazes de regular a expressão de genes. O fator de transcrição KLF11 é um dos menos estudados desta família e tem funções relacionadas a controle de crescimento celular via TGF- β (6,50), além de haver supressão deste fator quando o tecido cardíaco é exposto a angiotensina II e endotelina 1 (6,51,52), sugerindo a participação do KLF11 no processo de remodelamento da HC patológica. Além disso, também foi mostrado em literatura que o Fator de Necrose Tumoral do tipo alfa (TNF- α) ativa positivamente a expressão de KLF11, mostrando que este fator responde a estímulo pro-inflamatório (52–54).

Foi predito também que a expressão do KLF 11 ativa a via de sinalização da insulina, ou seja, que o KLF11 é capaz de ligar-se e produzir ação no receptor de insulina em células β -pancreáticas, sob alta concentração de glicose. Já no tecido cardíaco, o KLF11 é capaz de ligar-se a subunidade γ da proteína G, o que pode desencadear a via de sinalização da PKA (proteína quinase A), bem como tem a capacidade de ligar-se ao receptor de fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R), ativando a via de sinalização que desencadeará a ativação da proteína lipídeo quinase do subgrupo $I\alpha$ da PI3K, ativando em sua sequência a via bem conhecida da Akt-mTOR, que resultará na sinalização ribossomal da síntese de proteínas e, ainda, na maior translocação de Glut-4 para a membrana celular (6,7,51,54–57). Dessa forma, entende-se que o KLF11 pode estar relacionado à ativação de vias de HC e de captação de glicose, independentemente de maior aporte de chegada de insulina no tecido cardíaco, podendo ser o responsável pela melhora metabólica encontrada no miocárdio em comunhão à HC induzida pelo TFA.

De maneira bastante interessante, como mostrado por Youngren (58), a DM está associada a disfunções da sinalização intracelular da via da PI3K/AKT, uma vez que em coração de ratos e humanos diabéticos a fosfatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), regulador negativo da via da AKT, responsável por inibir a fosforilação e consequente ação da AKT, está aumentada, como demonstrado por Kondo e Kahn (59).

Com a tamanha importância dos mecanismos supracitados, mostrando que o TFA promove respostas fisiológicas estruturais e moleculares no coração, e que a DM vai ao encontro dessas respostas, promovendo estímulos patológicos neste tecido, e compreendendo que os estudos ainda não elucidaram totalmente os mecanismos de regulação direta dessas vias, faz-se necessário um maior estudo de mecanismos biomoleculares que possam estar regulando a via da PI3K/AKT, como as respostas geradas a partir da inibição ou superexpressão de miRNAs.

3.3 microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de ácido ribonucleico (RNA), com tamanho entre 17 e 25 nucleotídeos, não codificadoras de proteínas, agindo como potentes reguladores pós-transcricionais em plantas e animais (60,61). Análises de bioinformática indicam que aproximadamente um terço de todos os genes codificadores de proteínas são regulados por miRNAs, o que envolve, essencialmente, a modulação de todas as vias biológicas, demonstrando o alto grau de atuação dessas moléculas nos organismos vivos (62).

Os miRNAs atuam ligando-se à região 3'-UTR (região não traduzida) de RNAs mensageiros (mRNA), propiciando a redução dos níveis traducionais de seus genes alvos (60). Ou seja, o efeito biológico do aumento da expressão de um miRNA é a redução da expressão dos seus mRNAs-alvos, e, consequentemente, a diminuição da expressão das proteínas que viriam a ser traduzidas. Em contrapartida, o efeito da inibição de um miRNA é a ativação da expressão do seu gene alvo (63). Ainda, essas moléculas dependem do grau de complementaridade com o seu mRNA alvo: quando pareados completamente, promovem a total degradação do mRNA alvo, porém, quando pareados de forma incompleta, o miRNA promove a inibição da tradução do seu mRNA alvo em proteínas (61,64). Somado ao seu pequeno tamanho, este mecanismo de atuação indica que um único miRNA pode regular inúmeros mRNAs alvo, ou ainda, que vários miRNAs podem contribuir para o controle de um único mRNA, denotando uma complexa rede regulatória de sinalização celular vinda através da ação dessas moléculas (60,64,65).

Essas pequenas sequências de mRNA foram descobertas em 1993 por Lee e colaboradores (66), quando estes associaram o lin-4 com o desenvolvimento larval

de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans* - nematódes) (67). Porém, somente em 2001 seu papel foi revelado, com a demonstração de que o lin-4 exercia funções regulatórias a nível pós-transcricional, com complementariedade parcial com a região 3'UTR do mRNA da proteína lin-14 (68,69). O segundo miRNA somente foi descoberto 7 anos após a descrição do lin-4, e fora denominado let-7. Esta molécula também tem seu papel na regulação pós-transcricional, com complementariedade parcial com a região 3'UTR da proteína lin-41 (70,71). A posteriori, foi constatado que o let-7 e o lin-41 são evolutivamente conservados em metazoários, com homologia em moscas, camundongos e humanos, levando a perspectiva de que essas pequenas moléculas pudessem desempenhar funções similares as encontradas em *C. elegans* em outras espécies, inclusive em humanos (72,73).

Com essa hipótese, novos miRNAs passaram a ser descobertos e investigados no início dos anos 2000, e atualmente já são conhecidas mais de 28.645 sequências de miRNAs maduros (capazes de exercer função biológica), em mais de 220 organismos diferentes, de protozoários à animais, segundo o banco de dados de bioinformática miRBase (74). Ainda de acordo com o site miRBase 21.0, até 2016 haviam aproximadamente 2.588 miRNAs maduros na espécie humana, e que este número cai para aproximadamente 1.915 em camundongos, denotando que a quantidade de miRNAs maduros correlaciona-se com a complexidade dos organismos estudados, e que esta classe de moléculas potencialmente é uma das maiores reguladoras gênicas endógenas encontradas até os dias atuais (75,76).

Considerando essas descobertas, faz-se necessário o entendimento dos mecanismos de gênese e ação dos miRNAs.

3.3.1 Biogênese e função dos microRNAs

Os miRNAs são transcritos pela enzima RNA polimerase II, no núcleo celular, que a partir do genoma geram um transcrito primário chamado pri-miRNA, que somente após passar por clivagens realizadas por complexos enzimáticos, poderão tornar-se miRNAs maduros e capazes de cumprir suas funções biológicas (63,77).

Os pri-miRNAs possuem estrutura de dupla hélice do tipo hairpin, ou grampo, e apresentam cerca de 300 nucleotídeos. Sofrem, ainda no núcleo, a ação de um complexo enzimático, que abrange uma ribonuclease do tipo III chamada Drosha, e

seu cofator essencial DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8), clivando-os em moléculas menores, contendo um trecho dupla fita, com uma alça em fita simples. Ao serem processadas pela Drosha, os pri-miRNAs passam a ser denominados pré-miRNAs, ou seja, moléculas precursoras de miRNAs maduros, e que apresentam cerca 70 nucleotídeos (60,78).

Estes pré-miRNAs são então transportados para o citoplasma celular através de uma proteína de exportação nuclear dependente de GTP chamada exportina 5. Já no citoplasma, os pré-miRNAs sofrem a ação de uma terceira enzima, uma ribonuclease do tipo III conhecida como Dicer, originando moléculas de RNA em dupla fita (duplex), que possuem entre 17 e 25 nucleotídeos, sendo uma dessas fitas é o miRNA maduro, e a outra, sua fita anti-sense (76,79).

O produto da clivagem da Dicer é, então, incorporado por um complexo chamado RISC (*RNA-induced silence complex*), que é consistido primordialmente por proteínas do tipo Argonautas, responsáveis por atividade de endonuclease dirigida, sendo assim, os principais componentes de atuação na catálise realizada pelo complexo RISC (77,80). Através da ação das proteínas Argonautas, apenas uma das fitas do duplex permanece no complexo RISC, podendo exercer sua função reguladora da expressão pós-transcricional do seu gene alvo, enquanto que a outra fita, anti-sense, com menor estabilidade, será degradada (81–83).

Assim, a partir da fita de miRNA maduro, a regulação da expressão endógena de genes ocorre através do pareamento do miRNA, majoritariamente através de uma pequena região entre os segundo e oitavo nucleotídeos na extremidade 5'UTR dessa molécula, conhecida como região *seed*, à extremidade 3'UTR do seu mRNA alvo, sendo, portanto, a região de preferencia para o acoplamento dos miRNAs aos seus mRNA alvos (68,84,85). Dessa forma, através da ligação miRNA-complexo RISC à região *seed* da 3'UTR do mRNA alvo, há a efetivação do mecanismo de regulação pós-transcricional negativa do miRNA, podendo ocorrer de duas formas, como demonstrado na figura 3. A primeira é dada pela degradação total do mRNA alvo do miRNA, que ocorre quando há pareamento, ou complementariedade, perfeito entre os nucleotídeos dessas moléculas(86). Esta função é mais aparente em plantas. Já a segunda, predominante em animais, ocorre através da complementariedade imperfeita entre o miRNA em questão, e seu mRNA alvo. Quando há esse tipo de pareamento, o mRNA é inibido, sem que haja sua total degradação, resultando em repressão da tradução proteica (84,85).

Figura 3: Biossíntese de microRNAs. Estas moléculas iniciam-se como pri-microRNAs no núcleo celular, são então clivados pela enzima Drosha, formando um filamento menor denominado pré-microRNA que, com auxílio da proteína exportina 5 e outras proteínas, é exportado para o citosol da célula. Já no citosol, o pré-microRNA é clivado novamente, agora pela enzima Dicer, formando assim um filamento ainda menor dupla hélice. Para tornarem-se ativos, uma dessas fitas deve ser degradada, enquanto que a remanescente deve ter entre 17 e 22 nucleotídeos. Esta fita simples menos, juntamente com outras proteínas, irá compor o complexo RISC, onde desempenhará sua função: ao encontrar um RNA mensageiro-alvo, ligar-se a este em pareamento perfeito ou não, degradando ou inibindo, respectivamente, a tradução desse RNA mensageiro.

Essa fina regulação de expressão gênica e proteica desempenhada pelos miRNAs, e o conhecimento de que a expressão dessas pequenas moléculas é fortemente modulada pelo treinamento físico (TF), desperta enorme curiosidade no entendimento desse processo enquanto resposta para as diversas modulações benéficas ocasionadas pelo TF no coração e no músculo, e ainda, na possibilidade de identificação e de uso dessas pequenas moléculas como potentes marcadores de desempenho físico.

3.3.1 microRNAs, TFA e Diabetes Mellitus

Os miRNAs são importantes fatores da regulação gênica da HC, de vias metabólicas e de enzimas, e o treinamento físico é capaz de regular a expressão

desses miRNAs (34). Com isso, em nosso Laboratório, ratos Wistar saudáveis foram treinados sob dois protocolos (P1 e P2) de TFA de natação, com aumento de volume de treinamento entre estes, promovendo HC fisiológica (34).

Os ventrículos esquerdos (VE) desses animais foram retirados e o RNA total extraído para análise de microarray, ou seja, um *screening* dos miRNAs *up* e *down* regulados por ambos os protocolos do TFA. Em dados ainda não publicados, observou-se uma diminuição acentuada do miRNA-34c-3p (P1: 97,31%; P2: 98,16) indicando que este miRNA pode estar envolvido com os ganhos cardíacos gerados pela HC fisiológica.

Em investigação dos possíveis genes alvos do miRNA-34c-3p, através de análise *in silico* por programas de bioinformática (targetscan, mirorg, mirbase), verificou-se que o miRNA-34c-3p possui como um de seus genes-alvo o eIF4E, que apresenta 2 sítios conservados de ligação para este miRNA, sendo ele o 4º principal alvo do miRNA-34c-3p (87). Ainda, de acordo com Bernardo e colaboradores (88), todos os componentes da família de microRNA-34 são superexpressos no miocárdio em resposta à stress, indicando que possivelmente este miRNA esteja aumentado HC patológica.

Compreendendo que acompanhando a HC fisiológica deve haver melhora metabólica, foi investigado outro gene que pudesse estar envolvido com essa melhora, chegando ao responsável por traduzir a proteína KLF 11, que apresenta 4 sítios conservados de ligação para este miRNA sendo ele o 3º principal alvo do miRNA-34c-3p.

Em dados produzidos durante a iniciação científica, que serão publicados juntamente com os resultados dessa dissertação, foi feita a validação do KLF11 enquanto gene alvo do miRNA-34c-3p através de ensaio de luciferase, quando houve redução de luminescência de 55,3% nas células tratadas com o plasmídeo contendo a região 3'UTR do KLF e com o miRNA-34c-3p, em comparação com células tratadas apenas com o plasmídeo contendo a 3'UTR do KLF11, como apresentado na figura 4A. Ainda em cultura primária de cardiomiócitos, foi mostrada que a inibição do miRNA-34c-3p aumenta em 193% a expressão gênica do KLF11, já a sua superexpressão reduz a expressão deste gene em 60,4% (figura 4B). Em resultados congruentes a este, houve aumento de 12,31% na captação de glicose do meio de cultura celular nessas mesmas células. Somados, esses resultados indicam que além de existir a regulação negativa do miRNA-34c-3p com o KLF11, há também indícios

da eficiência desse gene em produzir modificações que possam justificar o aumento da captação de glicose e até mesmo da translocação de Glut-4 induzida pelo TFA, dado a inibição desse miRNA frente ao TFA.

Figura 4: Validação do KLF11 como gene alvo do microRNA-34c-3p. A) Atividade relativa de Luciferase ao ligar-se à *renilla* presente no substrato *LightSwitch*, com valores corrigidos pelo normalizador interno da transfecção, a Cipridina, em ensaio de validação do KLF11 como gene alvo do miRNA-34c-3p. Amostras do controle, KLF11 mmiRNA-34c-3p, controle *random*, *Random* mmiR-34c-3p respectivamente. Médias de três ensaios independentes, com barras representando erro padrão. *p<0,02. B) Expressão do KLF11 em VE de neonatos, mostrando aumento significativo de 192% entre o grupo controle e as células tratadas com amiR-34c-3p a 50nM, e redução também significativa de 60,41% com as células tratadas com mmiR-34c-3p também a 50nM. *p<0,006 vs. controle; # p<0,001 vs. mmiR-50nM.

Assim, considerando os dados e evidências acima expostos, culmina-se na hipótese de que o TFA pode promover avanços fisiológicos cardiovasculares em ratos diabéticos, levando conseqüentemente a melhorias no metabolismo oxidativo deste tecido, bem como a promoção de hipertrofia cardíaca fisiológica, resultando, por fim, na melhor eficiência da captação e armazenamento de glicose em resposta ao TFA através da ativação de via independente da insulina.

4 Metodologia

4.1 Ensaios *in vitro*

4.1.1 Cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos

Para estabelecer a relação direta entre cardiomiócitos e a inibição do miRNA-34c-3p, foram utilizados ratos Wistar neonatos, de 1 a 3 dias de idade, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICBUSP). Os animais foram anestesiados e desinfetados com álcool 70% e sacrificados em condições assépticas. O coração foi rapidamente retirado, os ventrículos e átrios separados, descartando os últimos. Os ventrículos foram, então, submetidos a um processo de digestão enzimática em tampão à base de collagenase tipo II (Worthington) e pancreatina (Invitrogen), seguindo os procedimentos ilustrados na figura 5.

Figura 5: Esquema ilustrativo do processo de extração de cardiomiócitos. Protocolo de extração de cardiomiócitos de ratos neonatos. Após retirada asséptica dos corações, os ventrículos são separados e incubados em tampão de digestão contendo collagenase e pancreatina, em *shaker* à 37°C. Após o período de 15 minutos, o sobrenadante passa pelo estágio de pré-plating, sendo as células em suspensão incubadas em estufa úmida à 37°C. Esse estágio tem por intenção iniciar a separação de fibroblastos que, por ter capacidade de aderência maior do que os cardiomiócitos, acabam por ficar retidos nessa primeira garrafa. O sobrenadante desta garrafa passará pelo gradiente de Percoll.

Após sucessivas digestões enzimáticas, o homogenato celular foi submetido à centrifugação em um gradiente descontinuo de *Percoll* (Amersham Biosciences), para a separação dos cardiomiócitos dos demais tipos celulares presentes, como ilustrado na figura 6. Subsequentemente, os cardiomiócitos foram plaqueados em meio DMEM-H (*Dulbecco's modified Eagle's médium – high glucose*, 4,5g/L de glicose, Invitrogen) suplementado com 5% de soro de bezerro neonato (NCS, Invitrogen) e 10% de soro de cavalo (Invitrogen) a 50-60% de confluência. As placas foram mantidas em estufa úmida a 5% de CO₂, sob condições estéreis durante a realização dos experimentos. Foi utilizado um “n” de 3, quando cada extração e digestão enzimática corresponde a n=1.

Figura 6: Esquema ilustrativo do Gradiente de Percoll para separação de cardiomiócitos e demais células do miocárdio. Em sequência, observa-se a construção do Gradiente de Percoll, sendo adicionada primeiro a solução com menor densidade (TOP), seguida da solução com maior densidade (BOTTOM). O homogeneizado celular é então adicionado cuidadosamente em cima do gradiente. Após a centrifugação, é possível visualizar uma camada superior contendo a nuvem de fibroblatos e, entre o TOP e o BOTTOM, observam-se os cardiomiócitos.

4.1.2 Transfecção com antagoniR e miRmimic do microRNA-34c-3p

Após 24 horas do plaqueamento, os cardiomiócitos foram tratados *overnight* com meio sem soro, em processo de *starving*, ou seja, as células sofreram restrição dos nutrientes encontrados no soro, mecanismo que visa aumentar a eficiência da transfecção. No dia seguinte, os cardiomiócitos foram lavados com tampão fosfato

(PBS) para que vestígios do meio de cultura anteriormente utilizado ou mesmo possíveis *debris* de células mortas sejam eliminados, proporcionando um ambiente favorável a uma captação efetiva dos reagentes pelas células.

As células foram então transfectadas em duplicata com o antagomiR-34c-3p, para inibir a expressão do miRNA-34c-3p (amiR-34c-3p) e, como contraprova, com o miRmimic-34c-3p (mmiR-34c-3p), que superexpressa este miRNA. Para tanto, utilizamos o reagente Oligofectamine™ (Invitrogen) em meio Opti-MEM® (Gibco) sem soro, seguindo as especificações do fabricante.

Para a transfecção do amiR-34c-3p ou do mmiR-34c-3p, foi diluído 2,5µL do oligonucleotídeo a concentração de 50nM em 40 µL de Opti-MEM® I sem soro, para um volume final de 42,5µL no tubo 1. Já no tubo 2, foi diluído 1µL de Oligofectamina™ em Opti-MEM® I sem soro, para um volume final de 7,5µL. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Após a incubação, o conteúdo do tubo 2 foi gentilmente homogeneizado ao tubo 1, resultando em volume final de 50µL. Esta combinação foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente para formação do complexo lipídio-oligonucleotídeo. Enquanto o complexo estiver em período de incubação, as células foram lavadas em meio sem soro, e 200µL de Opti-MEM® I sem soro foi adicionado a cada poço. Terminada a incubação, os 50µL do complexo lipídio-oligonucleotídeo foram adicionados às células, que foram mais uma vez incubadas a 37°C em estufa úmida a 5% de CO₂ sob condições estéreis por 4 horas. Após este último passo, foi adicionado 125µL do meio de cultura DMEM-H contendo 3 vezes a concentração normal de soro, sem que fosse removida a mistura de transfecção. As células foram incubadas em estufa úmida a 5% de CO₂ por 72 horas, quando foram extraídas e/ou submetidas aos tratamentos específicos de cada metodologia subsequente a esta. Este protocolo foi ilustrado na figura 7.

Figura 4: Protocolo de Transfecção com Oligofectamine™. No passo 1, tem-se a diluição do amiR-34c-3p ou mmiR-34c-3p em Opti-MEM; no passo 2, em um segundo tubo, tem-se a diluição de Oligofectamine™ em Opti-MEM; no passo 3, após incubar os 2 tubos anteriores a temperatura ambiente, deve-se misturar gentilmente o volume do tubo 2 no tubo 1, e incubar o novo complexo por 20 minutos a temperatura ambiente. No passo 4, adiciona-se todo o volume do passo 3 nos poços de células contendo Opti-MEM. Incubar os poços por 4 horas a 37°C. Após as 4 horas, adiciona-se novo meio contendo 3 vezes a quantidade normal de soro utilizado para o cultivo da célula, no caso, deve-se adicionar DMEM-H com 30% de soro de cavalo e 15% de soro de bezerro neonato.

4.1.3 Determinação da concentração ideal do amiR-34c-3p e mmiR-34c-3p

Para iniciarmos os experimentos com os inibidores e superexpressores do miRNA-34c-3p, precisávamos primeiramente determinar a concentração ideal destes reagentes, considerando a toxicidade às células, eficiência de transfecção e resposta ao tratamento. Realizamos então curva de inibição o amiR-34c-3p, e superexpressão com mmiR-34c-3p em 6 concentrações distintas: 0nM (controle), 1nM, 5nM, 10nM, 50nM e 100nM.

4.1.4 Transfecção com RNA de interferência para os genes eIF4E e KLF11

Como contraprova aos achados com a inibição e superexpressão do miRNA-34c-3p, utilizamos de *small interfering RNA* (siRNA) para promover a atenuação da expressão dos genes alvos desse estudo, o eIF4E e o KLF11. Para tanto, as células seguiram os processos de plaqueamento descrito nos itens 4.1.1 e 4.1.2.

As células foram então transfectadas em duplicata com o siRNA para o eIF4E ou com o siRNA para o KLF11, para inibir a expressão do seu respectivo mRNA. Para

tanto, utilizamos o reagente Lipofectamine RNAiMAX™ (Invitrogen) em meio Opti-MEM® (Gibco) sem soro e sem antibiótico, seguindo as especificações do fabricante.

Para a transfecção, o siRNA foi diluído em 1µL do oligonucleotídeo a concentração de 5, 10 e 20µM em 50 µL de Opti-MEM® I sem soro e sem antibiótico, para um volume final de 51µL no tubo 2. Já no tubo 1, foram diluídos 3µL de Lipofectamina RNAiMAX™ em Opti-MEM® I sem soro, para um volume final de 53µL. Então, o conteúdo do tubo 1 foi gentilmente homogeneizado ao tubo 2, resultando em volume final de 104µL. Esta combinação foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente para formação do complexo lipídio-oligonucleotídeo. Enquanto o complexo estava em período de incubação, as células foram lavadas em meio sem soro, e 450µL de meio de plaqueamento sem antibiótico foi adicionado a cada poço. Terminada a incubação, os 50µL do complexo lipídico catiônico-oligonucleotídeo foram adicionados às células, que foram mais uma vez incubadas a 37°C em estufa úmida a 5% de CO₂ sob condições estéreis por 24 horas. Após este último passo, foi feita a transfecção com amiR-34c-3p ou mmiR-34c-3p, seguindo os mesmos passos aqui relatados e ilustrados na figura 8. As células foram incubadas em estufa úmida a 5% de CO₂ por mais 48 horas, quando foram extraídas.

Figura 8: Protocolo de Transfecção com Lipofectamine RNAiMAX™. No passo 1, tem-se a diluição da Lipofectamine RNAiMAX™ em Opti-MEM; no passo 2, a diluição do siRNA a concentração desejada em 1µL em Opti-MEM. Adiciona-se gentilmente o conteúdo do tubo 1 no tubo 2, e incuba-se

o complexo lipídico catiônico-oligonucleotídeo por 5 minutos a temperatura ambiente. No passo 4, adiciona-se 50µL do complexo as células com meio de plaqueamento sem antibiótico. Incuba-se a placa por 24 horas, e procede-se, sob os mesmos procedimentos descritos, a transfecção com amiR e mmiR, incubando a placa por 48 horas em estufa úmida a 5% de CO₂ e 37°C.

4.1.5 Análise da expressão gênica do miRNA-34c-3p

4.1.5.1 Extração do RNA total

Setenta e duas horas após a transfecção com amiR ou mmiR, ou ainda após a transfecção com os siRNA para eIF4E ou KLF11, foi realizada a extração do RNA total de cada amostra com 300µl de TRIZOL Reagent® (Invitrogen), e os procedimentos de purificação do RNA total seguiram as indicações do fabricante. O RNA precipitado foi lavado com etanol 75% para retirar quaisquer resquícios de fenol e sal, e foi solubilizado em água DEPC, livre de RNase. A concentração de cada amostra de RNA total foi quantificada em espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, EUA). Após a quantificação dos RNAs, a integridade dos RNAs extraídos foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, por 60 minutos, a 100 volts. A viabilidade das amostras foi analisada a partir da intensidade das bandas correspondentes as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal (Figura 9).

Figura 9: Análise da integridade de RNA total de cardiomiócitos por eletroforese em gel de agarose.

4.1.5.2 Síntese de cDNA para o miRNA-34c-3p

Com o RNA total solubilizado e quantificado, o cDNA para análise do miRNA foi sintetizado utilizando-se, para tanto, de *primers* específicos para o miRNA-34c-3p e para o U6 snRNA (normalizador da técnica). A análise foi feita de acordo com o protocolo TaqMan microRNA Assay (Applied Biosystems, CA, EUA). Foram utilizados 10ng de RNA total, diluídos em um volume de 200µl, para preparação de uma RT *master mix* com dNTPs 100mM, *multiscribe reverse transcriptase* 50U/ml, tampão 10x para a enzima, inibidores de RNase 20U/ml, totalizando 7µl. Foi então adicionado 3 µl de *primer* para cada amostra e água livre de nuclease para completar o volume de 15µl de reação. A reação de síntese de cDNA foi realizada a 16°C por 30 minutos, 42°C por mais 30 minutos, 85°C por 5 minutos, em termociclador, e após as amostras foram mantidas a 4°C, e armazenadas em *freezer*-20°C.

4.1.5.3 Reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR) para expressão do miRNA-34c-3p

Para 20µl finais da reação de PCR foram incluídos 1,33µl do cDNA acima sintetizado, 10µl de TaqMan 2X Universal PCR master mix II, 1µl de *primer* (TaqMan microRNA Assay 20X) específico para miRNA-34c-3p ou U6, e 7,67µl de água livre de nucleases. As reações foram pipetadas em duplicata em placa de 96 poços específicas para este fim, incubadas a 95°C por 10 min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. A fluorescência foi lida em detector ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems).

4.1.6 Análise da expressão gênica de genes

4.1.6.1 Expressão dos genes

Na sequência e na mesma amostra de RNA total foi analisada a expressão gênica de genes de interesse. Para tanto, foi feita a síntese de cDNA de acordo com o protocolo da Fermentas Thermo Scientific. Em seguida, foi feita a reação de

polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR) com o uso do SYBR® Select Master Mix.

4.1.6.2 Síntese de cDNA para os genes estudados

Foram utilizados 2µg do RNA total extraídos segundo o item 4.14.1. As amostras foram incubadas com 0,5 µg/mL de oligo dT12-18 a 65°C por 5 min, para obtenção da primeira fita de cDNA. A transcrição reversa das amostras foi realizada em volume total de 20µL contendo 3U de RNAsin (Promega, EUA), 10mM de dNTPs, 0.1 M de DTT, 1X tampão de enzima, e 2,5U de SuperScript Reverse Transcriptase II (Invitrogen, Brasil). Após incubação por 1 hora a 42°C, a temperatura foi elevada a 95°C por 5 minutos e as amostras foram rapidamente colocadas em gelo para denaturação de híbridos RNA-cDNA formados. Os cDNAs foram então armazenados em freezer-20°C.

4.1.6.3 Reação de RT-PCR para expressão do miRNA-34c-3p

O RT-PCR para análise da expressão gênica dos RNAs mensageiros alvos dos miRNAs, e outros genes de interesse, foi feito pelo sistema de detecção do produto específico amplificado no equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied-Biosystems) na presença do composto fluorescente SYBR-Green PCR Master Mix. A otimização da reação do real time PCR foi feita conforme as instruções do fabricante, corrigido para volume final de 10µL por reação. As condições de PCR foram padrão (protocolo do kit SYBR-Green master mix) e todos os reagentes foram fornecidos pelo *kit*, incluindo a enzima polimerase AmpliTaq-Gold (Applied-Biosystems).

4.1.6.4 Desenho dos *primers* estudados

Para realização das análises de expressão gênica dos genes de interesse, foi desenhado e sintetizado um par de *primers* específicos para cada um desses genes. As sequências, *forward* e *reverse*, foram as seguintes:

Gene		Sequência 5':3'
Ciclofilina	<i>Foward</i>	TGGCAAGCATGTTGGGTCTTTGGGAAG
	<i>Reverse</i>	GGTGATCTTCTTGCTGGTCTGCCATTC
β -actina	<i>Foward</i>	TCCCTGGAGAAGAGCTATGA
	<i>Reverse</i>	TACCCAGGAAGGAAGGCTG
α -actina esquelética	<i>Foward</i>	GCTCTTCCAGCCTTCCTTT
	<i>Reverse</i>	ACGTTGTTGGCGTACAGGT
ANF	<i>Foward</i>	CTTCGGGGGTAGGATTGAC
	<i>Reverse</i>	CTTGGGATCTTTTGCGATCT
α -MCP	<i>Foward</i>	CGAGTCCCAGGTCAACAAG
	<i>Reverse</i>	AGGCTCTTTCTGCTGGACA
β -MCP	<i>Foward</i>	CATCCCCAATGAGACGAAG
	<i>Reverse</i>	CCATAAAGAATGCGGTTGG
COL1A1	<i>Foward</i>	GAGAGAGCATGACCGATGGATTCCAG
	<i>Reverse</i>	GGGAGGCCTCGGTGGACATCAG
COL3A1	<i>Foward</i>	CCAAGGTCCACGAGGTGACAAAGG
	<i>Reverse</i>	CAGGGCCTGGACTACCAACTGCAC
MMP2	<i>Foward</i>	TTGCTGGTGGCCACATTCT
	<i>Reverse</i>	GCCTCGTACACGGCATCAA
PIK3R2	<i>Foward</i>	TGTCTGTCTTCTAATTCCCTTCCCCTGGTG
	<i>Reverse</i>	GCCCCGCAGCCTCTGTAAACATGG
AKT	<i>Foward</i>	GAGACCGACACCAGGTATTTTGATGAGGAG
	<i>Reverse</i>	GCCTCCGTTCACTGTCCACACACTCC
mTOR	<i>Foward</i>	TTTGAGCATGCCGTCAATAATACCAG
	<i>Reverse</i>	ATAATTGGTTCTTCGGTCAAACCAC
eIF4E	<i>Foward</i>	GGATCTAGTGAAATGAGGTGTGGCTGTCAC
	<i>Reverse</i>	GCATTCTTCTCTCACCAGCGGTCTCC
eIF4BP1	<i>Foward</i>	CCTGATGGAGTGTCTGGAAC
	<i>Reverse</i>	GGCTAGTGACCCCTGGAAT
eIF4G	<i>Foward</i>	CACTCTATGCTCTCCAGGCCCTTGTAGTG
	<i>Reverse</i>	CCACACCCTTGCCCTGCTGTTTCCAG
KLF11	<i>Foward</i>	CTGTTCCCCATCGACAAAG

	<i>Reverse</i>	ACAGGGATCATCTGGCAA
Glut-4	<i>Foward</i>	ATCATCCGGAACCTGGAGG
	<i>Reverse</i>	GTCAGACACATCAGCCGAGC
IRS1	<i>Foward</i>	CACGGCTCCACTTCAGACT
	<i>Reverse</i>	CGCAGGGACTAGAGCCATA
IRS2	<i>Foward</i>	CGCCACAGTTCAGAGACCT
	<i>Reverse</i>	TTGCCTTCACTGCTTTTCC
IGF	<i>Foward</i>	CAGTTCGTGTGTGGACCAAG
	<i>Reverse</i>	GTCTTGGGCATGTCAGTGTG

Tabela 1: Desenho das sequencias *foward* e *reverse* dos *primers* utilizados para análise da expressão gênica dos RNA mensageiros estudados.

Depois da otimização, os *primers* específicos para cada gene foram utilizados na concentração de 200nM para detecção e quantificação relativa da expressão dos RNAs mensageiros.

Quantidades relativas de expressão do gene alvo foram comparadas após a normalização dos valores de controlo interno (ΔCT). A análise das possíveis diferenças entre a expressão dos mRNAs entre os grupos foi calculada utilizando as diferenças em valores dos ΔCT entre os grupos ($\Delta\Delta CT$) e a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Como controle interno da técnica, foi feita média geométrica entre a média do CT da duplicata de cada amostra para a ciclofilina e β -actina ambos considerados de ampla expansão e pouca variabilidade entre grupos com diferentes tratamentos. Assim, a média geométrica de cada amostra será utilizada como valor normalizador para os demais genes em estudo.

4.1.7 Dosagem de Glicose

Foram coletados 10 μ l do sobrenadante das células tratadas, e, após diluição em água livre de DNase e RNase, o conteúdo foi lido e mensurado no aparelho ACCU-CHEK Performa, utilizando-se das fitas reativas de mesma empresa e resultados gerados em miligrama por decilitro.

4.1.8 Ensaio de validação do eIF4E como gene alvo do miRNA-34c-3p

Para a validação do gene eIF4E, bem como fora feita com o gene do KLF11, como alvo do miRNA-34c-3p, foi feita a inserção da região 3'UTR do eIF4E no gene repórter pLightSwitch_3UTR (Active Motif, EUA), que possuía 3910 pares de bases nucleotídicas *a priori*, e, após a clonagem do inserto, passou a ter 6292 pares de base, sendo chamado de LS_eIF4E, conforme figura 10. Este plasmídeo, além da região 3'UTR do eIF4E, possui o gene repórter da luciferase, inserto este que permite a emissão de luz quando não há ligação ao inserto que o sucede, viabilizando a quantificação de sua atividade. Além deste plasmídeo, outro plasmídeo foi utilizado como controle externo do experimento. Este era composto pelo repórter (pLightSwitch_3UTR) e um inserto randômico (LS_Random), que, por possuir bases aleatórias, inviabiliza a ligação do miRNA-34c-3p à região inserida. Além do gene repórter para luciferase, os plasmídeos possuem ainda um gene de restrição para ampicilina, permitindo que seja feita a seleção de bactérias selecionadas com este plasmídeo, quando a amplificação deste se fez necessária.

Figura 10: Esquema do plasmídeo pLS_eIF4E, desenhado para validação do eIF4E como gene alvo do miRNA-34c-3p. Plasmídeo pLightSwitch_3UTR, que possui 3910bp, com o inserto da região 3'UTR do gene do eIF4E (1181bp), passando a ser chamado de pLS_eIF4E. Para a inserção do inserto do eIF4e, o plasmídeo foi primeiramente aberto (no sentido 5':3') com a enzima de restrição NheI, e posteriormente com a enzima XhoI, perdendo 12bp. O plasmídeo consiste em um região promotora da RenSP luciferase, onde ao ser adicionado o substrato para leitura da luciferase (substrato LightSwitch) a renilla se ligará emitindo luz, caso não haja a ação de um miRNA inibindo esta reação; a região 3'UTR do eIF4E, onde o miRNA-34c-3p hipoteticamente deverá ligar-se; e um sítio de resistência a ampicilina, mecanismo pelo qual há a possibilidade de amplificação deste plasmídeo a partir da transformação de bactérias que, ao receberem o plasmídeo ficarão resistentes a ação deste antibiótico.

Para o ensaio de luciferase, foram plaqueadas células CHO (*Chinese Hamster Ovary*), em número de $0,6 \times 10^5$ por poço, em placa de 24 poços previamente tratadas com gelatina a 3%, em meio DMEM-H suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, e 1% de penicilina, e foram incubadas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. As células CHO foram utilizadas por apresentarem pouca expressão espontânea do miRNA-34c-3p, permitindo a mensuração tão somente da interação ou não do gene estudado com o miRNA-34c-3p, reduzindo possíveis intervenções por miRNA-34c-3p endógenos.

Após 24 horas do plaqueamento das células CHO, o meio de cultura foi trocado para DMEM-H sem suplementação de soro, em processo de *starving*, e as células foram novamente incubadas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂, *overnight*. No dia seguinte, as células foram transfectadas com o reagente Lipofectamine 2000 (Life Technologies, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Para esta transfecção foram utilizados 1,3µg do LS_eIF4E ou LS_Random, 0,9µg de Cipridina (plasmídeo utilizado para normalização interna do experimento) e 5µl de mmir-34c-3p a 50nM, seguindo o desenho experimental abaixo exemplificado com a figura 11 e a tabela 2.

Figura 11: Desenho experimental do ensaio do gene repórter da luciferase para a validação do eIF4E como alvo do miRNA-34c-3p. A transfecção do LS_eIF4E foi realizada simultaneamente ao superexpressor do miRNA, o mmir-34c-3p. Quando a interação entre o miRNA-34c-3p e a região 3'UTR do eIF4E, clonada no LS_eIF4E, for verdadeira, haverá inibição pós-transcricional do mRNA da luciferase, resultando na diminuição dos níveis de luminescência. Entretanto, a cotransfecção do mmir-34c-3p com plasmídeo contendo uma região 3'UTR qualquer (LS_Random), não deve gerar uma diminuição na atividade da luciferase, uma vez que não haverá interação gene-miRNA.

Grupo Experimental	Controle	elF4E mmiR-34c-3p	Controle Random	Random mmiR-34c-3p
LS_elF4E	+	+	-	-
mmiR-34c-3p 50nM	-	+	-	+
amiR-34c-3p 50nM	-	-	-	-
LS_Random	-	-	+	+

Tabela 2: Grupos experimentais para a transfecção dos plasmídeos LS_elF4e ou LS_Random.

O controle apresenta apenas o LS_elF4E sem qualquer outro tratamento; elF4E mmiR-34c-3p, representa o grupo transfectado com o LS_elF4E e com o mmiR-34c-3p, sendo o grupo alvo deste experimento; controle Random, que não possui o plasmídeo LS_elF4E, mas sim o plasmídeo contendo um inserto qualquer que não a região 3'UTR do gene do elF4E, servindo como controle do Random mmiR-34c-3p; Random mmiR-34c-3p, que possui o LS_Random e o superexpressor do miRNA-34c-3p, sendo o controle do superexpressor do miRNA-34c-3p.

Após 72 horas da transfecção, 100µl do sobrenadante foram recolhidos, e a placa foi lacrada e incubada em *freezer* -80°C *overnight*, para que as células fossem rompidas, seguindo instruções do kit *LightSwitch Dual Assay System* da SwitchGear Genomics (EUA).

Para a leitura da atividade da luciferase através da luminescência, os substratos para leitura da luciferase (substrato da LightSwitch - LS) contendo Renilla, e para leitura do controle interno, a Cipridina (substrato BioLux - BL), foram diluídos seguindo as recomendações do fabricante.

Em placa branca de 96 poços, própria para leitura de luminescência, foram pipetados em duplicata 80µl do lisado de células e foram adicionamos 60µl do substrato LS, reação que aparece em laranja na figura 8. Na mesma placa, foram pipetados em duplicata 20µl do sobrenadante recolhido na extração e adicionados 10µl do substrato BL, reação que aparece em rosa na figura 12. A placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente, em ambiente protegido da luz. Após o período de incubação, foi feita a leitura no Vitor Light (PerkinElmer, EUA) seguindo instruções do fabricante dos substratos.

Figura 12: Placa branca específica para leitura de ensaios de luminescência. Pode-se visualizar os poços alaranjados, onde 80µl do lisado de células reagiu com 60µl do substrato LightSwitch, para leitura da interação Luciferase-renilla. Nos poços roseados, houve a reação entre 20µl do sobrenadante e 10µl do substrato BioLux, para leitura da atividade da Cipridina. Observa-se que entre um poço e outro foram deixados poços sem amostras, garantindo que não houve interferência de luminescência de uma amostra para outra.

Os dados foram analisados dividindo-se a absorbância do lisado (LS) pela absorbância do sobrenadante (BL).

Considerando a quantidade de plasmídeos LS_eIF4E, LS_Random, e Cipridina utilizados para a realização de 3 repetições independentes do experimento, n utilizado neste ensaio, foi necessária à amplificação desses plasmídeos.

4.1.8.1 Transformação de bactéria termocompetente para amplificação dos plasmídeos

Para amplificar os plasmídeos, foi utilizado o protocolo de transformação de bactérias termocompetentes. Em gelo, 1,5µl a 50ng/µl de cada plasmídeo amplificado foram adicionados a 100µl de bactérias *E. Coli* JM109 (Promega, EUA). Após homogeneizar a mistura, um choque térmico de 1 minuto e 30 segundos a 42°C, seguido de 2 minutos no gelo foi aplicado. As bactérias foram submetidas a um processo de crescimento em 1mL de SOC (meio LB de crescimento bacteriano enriquecido) em os tubos incubados em *shaker* por 45 minutos, a 37°C, em rotação de 170rpm. O meio foi centrifugado por 5 minutos, a 5000 rpm em temperatura ambiente, e o *pellet* de bactérias foi solubilizado em 200µl do próprio sobrenadante. 100µl de bactérias solubilizadas foram derramadas em placa de 100mm com LB+Agar+ampicilina na concentração de 1:1000. Estas placas foram incubadas a

37°C, *overnight*, para crescimento das colônias de bactérias selecionadas pela ampicilina. O processo de seleção das bactérias por antibiótico foi feito através da adição da ampicilina ao meio de crescimento (LB+Agar) de bactérias, onde apenas bactérias que incorporaram o LS_eIF4E, LS_Random ou Cipridina, plasmídeos que possuem o gene de resistência à ampicilina, conforme colônias visíveis na figura 13.

Figura 13: Placas de LB+Agar, contendo ampicilina a concentração de 1:1000, para seleção de bactérias transformadas com os plasmídeos de interesse. A) Colônias de bactérias transformadas com LS_eIF4E. B) Colônias de bactérias transformadas com LS_Random.

Após a incubação, uma colônia de cada plasmídeo foi selecionada e adicionada a um tubo estéril com 4mL de LB e ampicilina, formando o pré-inóculo. Os tubos foram então incubados por 12 a 16 horas, a 37°C em rotação média de 170-180 rpm.

Após as 12-16 horas, 3mL foram transferidos para um *erlenmeyer* com 300mL de LB e ampicilina, sendo este o inóculo. Os *erlenmeyer* foram incubados, por fim, em *shaker*, por 12 a 16 horas, a 37°C e rotação de 170-180rpm. O 1mL restante de cada pré-inóculo, foi congelado em glicerol 15% e estocados em *freezer* -80°C.

Após as 12-16 horas, os plasmídeos foram purificados através de um kit de purificação de DNA MaxiPrep (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Ao final do processo, os DNAs foram solubilizados em 100µl de água própria para experimentos de biologia molecular, quantificados e armazenados em *freezer*-20°C até uso.

4.1.9 Imunofluorescência para verificar hipertrofia cardíaca

Lamínulas de 13mm foram adicionadas a placa de cultura celular antes do plaqueamento dos cardiomiócitos para procedimento do ensaio de imunofluorescência. Ao término do tratamento com amiR-34c-3p e mmiR-34c-3p, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (PFA 4%), e mantidas em tampão fosfato (PBS) em geladeira. As lamínulas foram então bloqueadas com 5% *goat serum* em PBS 1x por 30 minutos a temperatura ambiente. Após o período de bloqueio, as lamínulas foram incubadas com anticorpos primários específicos para α -actinina (ABCAM, UK), e com secundários espécie-específicos fluorescentes Alexa Fluor® 488. As lamínulas foram então montadas com tampão de montagem contendo DAPI, para corar os núcleos das células, utilizando-se de esmaltes para fixar as lamínulas às lâminas. Estas foram analisadas em microscópio para fluorescência, com aumento de 63x.

4.1.10 Dosagem de glicose e lactato

O meio de cultura celular foi coletado em diferentes momentos pós-transfecção e ao término desta (1/2 hora, 1 hora, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas e 72 horas), e submetido a análise de fluido e gás no equipamento ABL800 Flex AutoCheck (Radiometer, ESP).

4.2 Ensaios *in vivo*

4.2.1 Animais experimentais

Para responder as hipóteses relacionando o TFA, a diabetes, o miRNA-34c-3p e seus genes alvos, foram estudados 40 animais Wistar provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e divididos nos seguintes grupos de 10:

- Euglicêmicos sedentários (ES): animais saudáveis que foram acompanhados ao longo do experimento sem que sofressem qualquer intervenção;
- Euglicêmicos treinados (ET): animais saudáveis que foram submetidos ao protocolo de TFA;
- Diabéticos sedentários (DS): animais que passaram por procedimento de indução ao diabetes por STZ e não foram submetidos ao TFA;
- Diabéticos treinados (DT): animais que passaram por procedimento de indução ao diabetes por STZ e foram submetidos ao TFA.

Estes animais foram mantidos no biotério da EEFUEUSP, sob ambiente controlado a temperatura de 22° a 24°C e em ciclo-invertido de claro-escuro, e água e comida foram administrados *ad libitum*. Estes ainda foram identificados, e pesados semanalmente para adaptação de carga de treinamento, e avaliação de progressão de massa corporal. Além disso, os animais tiveram a sua glicemia averiguada de maneira sistemática, com jejum prévio de 4 horas, no início do protocolo de indução a DM, após 3 e 7 dias, ao início do protocolo de TFA, após 1, 4, 8 semanas do início do protocolo de TFA, e após 10 semanas do início, ou seja, ao término do protocolo de treinamento.

Os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da EEFUEUSP, com número de protocolo 2016/01.

4.2.2 Escolha do modelo animal e indução a DM

Aos 45 dias de idade, os animais passaram por procedimento de indução à DM por injeção única intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) em concentração de 45mg/Kg (Sigma-Aldrich, MO, EUA). A STZ foi diluída em tampão citrato (0,01M), e injetada logo após seu preparo (89). Nos animais euglicêmicos, ES e ET, foi injetado o tampão citrato, em mesmo volume. Os animais passaram por um período prévio de 36 horas de jejum.

É importante ressaltar que a escolha desse modelo veio da impossibilidade de obtenção de um animal *knockout* para IR (receptor de insulina) ou mesmo de IRS1

e IRS2 (substratos do receptor de insulina 1 e 2, respectivamente) necessário para responder de forma integralmente satisfatória aos questionamentos acerca dos efeitos do TFA na inibição do miRNA-34c-3p e sua consequente ação no aumento da captação de glicose sem que haja a ação direta da insulina. Uma vez que o modelo considerado por estes pesquisadores como ideal é inviável, tem-se a possibilidade de entendimento dos mecanismos anteriormente citados com a depleção total da insulina no animal, ou seja, inviabilizar de maneira indireta os mecanismos desencadeados pela ação da ativação das subunidades a (extracelular) e b (citoplasmática) dos receptores de insulina no aumento da captação de glicose, bem como da utilização de ácidos graxos, e ainda de sinalização para síntese de proteínas contráteis, deixando apenas que os efeitos possivelmente observados sejam desencadeados por mecanismos alheios ao complexo insulina-receptor.

4.2.3 Dosagem da glicose sanguínea

A concentração sanguínea de glicose dos animais foi medida 3 dias após a indução à DM, para que fosse garantida a instauração da doença, através do aparelho *Accu-Check Active®* da Roche© e suas fitas reativas. A glicemia foi controlada 7 e 14 dias após a indução à DM, após a primeira semana de TFA, após a quarta, oitava e décima semana de TFA.

Foi utilizado como critério de seleção dos animais diabéticos, glicemia após jejum de 6 horas >126mg/dL medida no dia 3 após a indução por STZ, e confirmação de quadro diabético por glicemia casual >250mg/dL medida no dia 7 após a indução.

4.2.4 Protocolo de treinamento físico aeróbio de natação

O TFA teve início 14 dias após o procedimento para indução da DM ou da aplicação do tampão citrato, realizado segundo o protocolo de Medeiros e colaboradores (90). Este foi dado por 10 semanas de treinamento, em sessões diárias de 60 minutos, 1 vez ao dia, e 5 vezes por semanas, com aumento gradual e semanal de sobrecarga de trabalho até que fosse atingida 4% do peso corporal (peso na cauda corrigido pela porcentagem do peso corporal de cada animal), como demonstrado na

figura 14. O TFA foi realizado em um sistema de natação específico para ratos, com temperatura de água controlada entre 30° e 32°C. Este protocolo é caracterizado como de baixa a moderada intensidade e longa duração, promovendo adaptações cardiovasculares e aumentando a capacidade oxidativa do músculo cardíaco (90).

Figura 14: Desenho experimental do protocolo de Treinamento Físico dos animais. Indução da diabetes com injeção única de 45mg/kg ou tampão citrato 0,1M; protocolo de TFA de natação para ratos; além dos diferentes momentos de coleta de sangue, assinalados com uma gotícula de sangue; medidas do VO₂máx por protocolo escalonado, pressão arterial e frequência cardíaca por pletismografia de cauda, na primeira e na última semana do protocolo de treinamento. PC: peso corporal.

Pré e pós-TFA, os animais passaram por análises hemodinâmicas, glicêmicas e ao teste de tolerância ao esforço físico máximo. Findado o TFA, os animais foram anestesiados e mortos por decapitação, e amostras necessárias foram coletadas e adequadamente armazenadas para análises funcionais, histológicas, bioquímicas e moleculares.

4.2.5 Avaliação das respostas hemodinâmicas

A pressão arterial (PA) e a frequência cardíaca (FC) foram aferidas por pletismografia de cauda (Kent Scientific RTBP1001, EUA), nos 4 grupos experimentais. Este equipamento consiste em um manguito de borracha adaptado à

região proximal da cauda do animal. Ao ser ligado, o pletismógrafo insufla e desinsufla gradualmente o manguito de 1 a 200/250 mmHg. Em uma região distal da cauda, acopla-se um transdutor de pulso magnético com a intenção de detectar passagem de ondas de pulso da PA na artéria caudal, e os sinais foram registrados no sistema de aquisição de sinais.

4.2.6 Avaliação de tolerância ao esforço físico máximo

Para realizar o protocolo de avaliação ao esforço físico máximo, os animais dos 4 grupos experimentais foram posicionados individualmente sobre esteira rolante. Imediatamente após o posicionamento dos animais, o teste tem seu início com velocidade inicial de 6m/min sem que haja inclinação. O protocolo do teste é escalonado, ou seja, com incremento de 3m/min na velocidade a cada 3 minutos, até que seja atingida a velocidade máxima suportada pelos animais. O critério de exaustão do animal e consequente interrupção do teste foi o momento em que o animal não foi capaz de correr dentro da raia da esteira mediante, mediante o incremento de velocidade da esteira.

Este teste foi realizado pré e pós-TFA para que fosse feita a comparação da resposta do desempenho dos animais entre os grupos. Apesar desse teste não ser específico ao TFA realizado, já que é aplicado em esteira rolante, o mesmo será utilizado para auxiliar a verificação da eficácia do protocolo de treinamento na melhora da capacidade de esforço. Com este teste, foi comparado o tempo de corrida (em min), a velocidade máxima atingida (em m/min), e a distância percorrida (em m).

4.2.7 Gaiola Metabólica

Com o objetivo de melhor compreender o metabolismo dos animais, na última semana de TFA, estes foram submetidos à gaiola metabólica por 24 horas. Os animais receberam 250ml de água e 100g de ração específica para este procedimento. O peso dos animais foi averiguado antes e após o período de 24 horas. O volume de urina foi medido, e esta será armazenada para análises, *a posteriori*, de glicosúria e cetonúria. As fezes foram pesadas e descartadas. O volume de água ingerido foi medido pela

subtração do volume inicial pelo final, medidos em mesmo instrumento (proveta com marcação em mililitros). E a ingesta de ração foi analisada pela subtração do peso inicial pelo final, medidas em balança analítica.

4.2.8 Coleta das amostras

Finalizadas as 10 semanas de TFA, os animais foram anestesiados e decapitados. O sangue foi coletado para separação de soro e plasma, e armazenado em *freezer* -80°C. O coração foi dissecado, ventrículo direito e esquerdo foram separados, pesados e armazenados em diferentes condições permitindo as análises necessárias, tais quais: para análise de histoquímica e imunohistoquímica, o tecido foi fixado em uma massa de montagem a base de *tissue tek*, mantendo o tecido na posição correta, a montagem foi mergulhada em isopentano, um crioprotetor que evita possíveis artefatos na amostra, congelado e armazenado em nitrogênio líquido; para análise histológica, o VE foi colocado em cassete que fora imerso em formol 4% por 24 horas, passando por lavagem em álcool 70% por mais 24 horas, e mantido em álcool 70% até procedimento de inclusão em parafina; já para análise gênica e proteica, o tecido foi congelado em nitrogênio líquido, e armazenado em *freezer* -80°C. Além do coração (VE e VD), foram dissecados e armazenados em *freezer* -80°C tecidos como: pâncreas, fígado, gordura peritoneal, pulmão, rim e músculos esqueléticos.

4.2.9 Avaliação bioquímica de sangue

Com o intuito de melhor mapear as possíveis alterações causadas pelo TFA, o sangue foi coletado em tubos contendo ou não anticoagulante, que foram centrifugados por 15 minutos, a 3.000 rpm e 4°C. Os sobrenadantes foram retirados e armazenados em *freezer* -80°C.

Dessa forma, para obtenção de soro e plasma, os procedimentos a seguir foram tomados. Imediatamente após a retirada, o sangue fora mantido em gelo e centrifugado conforme já comentado. Foram utilizados dois tubos para coleta sanguínea: um com o anticoagulante heparina a 20u/mL de sangue, afim de obtenção

do plasma; e o outro sem tratamento, para obtenção do soro. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram retirados e armazenados a -80°C até que as análises foram realizadas, em um prazo máximo de 1 mês a contar do sacrifício dos animais.

Foram realizados ensaios para detecção de glicose, lactato, colesterol total, fração HDL e LDL, triglicérides, uréia, creatinina e ácido úrico por reagentes da Labtest (Minas Gerais, Brasil), e em Analisador Bioquímico Automático Labmax 240 (Tokyo Boeki Machinery LTD) seguindo a instrução de Instrução de Uso – Labtest Diagnóstica S/A. Foram utilizados, seguindo a normas de instrução de uso Labtest Diagnóstica, o material calibrador Calibra H, lote 4001, com expiração em 20/12/2017 e controle Qualitrol 1H, lote 4001, com expiração em 20/12/2017 e Qualitrol 2H do mesmo lote e data de expedição.

4.2.10 Avaliação da atividade da enzima Citrato Sintase

Com o intuito de observar possíveis melhoras no metabolismo aeróbio dos animais, foi feita a avaliação da atividade da enzima citrato sintase no VE para marcação de eficácia do TFA. Esta enzima catalisa a primeira reação do ciclo de Krebs, onde ocorre a condensação da acetil-coenzima A (acetil-CoA) com o oxaloacetato, formando citrato e coenzima A (CoA). Assim, o aumento da atividade de enzimas oxidativas, como a citrato sintase, indica otimização do metabolismo aeróbio.

Para avaliar a atividade da citrato sintase, o VE foi homogeneizado a 4°C em tampão de extração (pH 7,4) contendo Tris-base (50 mM) e EDTA (1 mM). As amostras foram então centrifugadas a 3000g por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi utilizado para a realização da cinética enzimática. As proteínas no homogeneizado foram quantificadas pelo método de Bradford (91).

A atividade máxima da enzima foi determinada segundo método de Alp e Newsholme (92), a partir de quantificação do complexo formado entre a CoA e o ácido 5,5'-ditio-bis 2 nitrobenzóico (DTNB), adicionado ao meio, formando um complexo amarelo. O tampão de ensaio foi composto por Tris-base (100 mM), DTNB (0,4 mM), acetil-CoA (1,24 mM), Triton X-100 1% (v/v) e o homogeneizado. A reação iniciou-se com a adição de oxaloacetato (18,9 mM) ao meio. O registro da cinética enzimática

foi realizado a 25°C durante um intervalo de 10 minutos, em 412nm com o uso do Victor 3 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer, EUA). O resultado da atividade da enzima foi expresso em valores de $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

4.2.11 Análise de expressão gênica do miRNA-34c-3p

4.2.11.1 Extração do RNA total

Foi homogeneizado 50-100mg de VE em 1mL de *Trizol* (Invitrogen), e os procedimentos seguiram as instruções do fabricante, como já relatado no item 4.1.4.1. O RNA precipitado foi solubilizado em água tratada com DEPC para eliminar possíveis RNase. A concentração das amostras foi quantificada usando espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, EUA). Após a quantificação, a integridade dos RNAs extraídos foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, como figura 15, e a viabilidade das amostras foi analisada considerando as intensidades de suas bandas correspondentes às subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal.

Figura 15: Análise da integridade de RNA total de VE por eletroforese em gel de agarose. M é o marcador com peso molecular; 1-9 amostras do grupo DS, 10-18 amostras do grupo ES, 19-26 amostras do grupo DT, 27-32 amostras do grupo ET, 33-42 amostras dos animais não responsivos ao tratamento com STZ.

A síntese do cDNA para o miRNA-34c-3p e seu normalizador, o U6, seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 4.1.4.2. Já a reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR), seguiu os procedimentos descritos no item 4.1.4.3.

4.2.12 Análise da expressão gênica dos genes de interesse

4.2.12.1 Extração do RNA total

Foram utilizados os mesmos RNAs totais extraídos conforme indicação do 4.2.11.1.

A síntese do cDNA para análise da expressão gênica seguiu o já descrito no item 4.1.5.2. Já a reação de RT-PCR seguiu o mesmo padrão relatado no item 4.1.5.3.

4.2.13 Avaliação histoquímica do VE

Após processo de inclusão em parafina, o VE foi cortado na espessura de 10µm, os cortes serão fixados com formaldeído e mantidos em lâminas silanizadas. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. A hematoxilina, que possui caráter básico, corou o núcleo das células, que possuem um grande aglomerado de grupamentos ácidos nos ácidos nucleicos (DNA e RNA), e por isso são basófilos, corando-se em roxo. Já a eosina, é um corante ácido, e cora em rosa estrutura acidófila como o citoplasma celular, e fibras de colágeno. Com esta técnica, os diâmetros dos cardiomiócitos foram quantificados e o conteúdo total das células foi determinado utilizando programa comercial Quantimet 500 (Cambridge Instruments, EUA).

4.3 Análise de dados

Os dados passaram pelo teste de Shapiro-Wilk, para verificar o padrão de distribuição dos mesmos, e a homoscedasticidade fora testada por Levene. Dado o caráter independente dos dados, estes devem apresentar distribuição normal e variâncias homogêneas, pressupostos para análises paramétricas.

Os dados foram analisados por análise de variância ANOVA de duas vias (TFA e diabetes como fatores independentes), e, quando pertinente, seguida do teste *post-hoc* de Tukey. O nível de significância adotado para todos os experimentos e análises será de 5% ($p < 0.05$).

5 Resultado

5.1 Resultados *in vitro*

5.1.1 Inibição do miRNA-34c-3p

Com a análise dos dados do RT-PCR, como mostrado na figura 16A, tem-se que todas as concentrações de amiR-34c-3p mostraram-se diminuídas quando comparadas ao controle, com $p < 0,0002$, mostrando que o tratamento foi eficaz na inibição do miRNA-34c-3p, com redução de 45% entre o controle (0nM) e a primeira concentração testada (1nM). Conforme pode ser observado na figura, a redução da expressão do miRNA-34c-3p é progressiva e significativa até a concentração de 50nM, quando se observa uma redução de 71,1% em relação ao controle. Entretanto, quando as células foram tratadas com a maior concentração do inibidor (100nM), a inibição do miRNA-34c-3p mostra-se menos eficiente do que com concentração a 50nM, indicando que há saturação do tratamento com a dose mais alta do amiR-34c-3p. Assim, para estabelecer a dose ideal, a qual foi usada durante os demais ensaios, foi feita análise entre as concentrações de 10nM e 50nM, que se mostraram mais interessantes ao estudo no que tange a descoberta da concentração que promove inibição mais acentuada. Houve redução de 1,87% entre essas doses, representando $p < 0,005$, indicando que o tratamento com o amiR-34c-3p na concentração de 50nM foi mais eficiente na inibição do miRNA-34c-3p, sendo, portanto, a dose ideal para a transfecção com amiR-34c-3p.

Figura 16: Relação entre as diferentes concentrações do amiR-34c-3p ou mmiR-34c-3p transfectados em cardiomiócitos, analisado por RT-PCR. Dados em % do controle, em expressão de mRNA obtida a partir de análise de RT-PCR, com *primer* específico para o miRNA-34c-3p. A) Análise

com o inibidor do miRNA-34c-3p (amiR). B) Análise do superexpressor do miRNA-34c-3p (mmiR). * $p < 0,0002$ vs. controle; § $p < 0,0003$ vs. amiR-1nM; \$ $p < 0,0003$ vs. amiR-5nM; # $p < 0,005$ vs. amiR-10nM.

Com o intuito de garantir que a expressão do miRNA-34c-3p é alterada tanto no sentido da inibição quanto no da superexpressão, foi realizada uma curva com as seis diferentes concentrações para o tratamento com o superexpressor do miRNA-34c-3p, o mmiR-34c-3p. Com a figura 16B, temos que o mmiR-34c-3p promove um aumento da expressão no miRNA-34c-3p em todas as 5 concentrações testadas (1nM, 5nM, 10nM, 50nM e 100nM), com $p < 0,0004$ em comparação com o controle (0nM). Apesar de o aumento da expressão do miRNA-34c-3p ter sido significativo na interação entre todas as concentrações, houve um aumento ainda mais exacerbado quando testada a concentração de 50nM do mmiR-34c-3p, quando há diferença de 41000% em relação ao controle. Apesar de a diferença ser significativa, ainda que em menor escala (25000%), entre todas as concentrações e a de 100nM, observa-se que este ponto mostra a saturação da célula em captar o reagente, causando potencialmente danos a estrutura dos miócitos, além de promover morte celular. Assim, para manter a máxima eficiência do tratamento sem que haja danos às células, a concentração de 50nM foi estabelecida como ideal, e consequentemente escolhida para os demais ensaios com o mmiR-34c-3p.

5.1.2 eIF4E e genes correlatos

Após garantir que o tratamento com o amiR-34c-3p e com mmiR-34c-3p de fato promovem os efeitos esperados, foi feita a análise da expressão gênica do eIF4E, alvo predito para o miRNA-34c-3p. Como apresentado na figura 17A, observa-se um aumento de 63,58% na expressão do eIF4E quando inibimos o miRNA-34c-3p com amiR-34c-3p a concentração de 50nM. Em comunhão a este dado e à expressão do miRNA estudado, há inibição em 53,37% do eIF4E em relação ao controle ($p < 0,003$) quando utilizado o mmiR-34c-3p na concentração de 50nM. Quando comparadas as porcentagens de expressão das células tratadas com amiR-34c-3p e com o mmiR-34c-3p, há uma diferença de 116,95% ($p < 0,0025$), mostrando realmente que tanto a inibição quanto a superexpressão do miRNA-34c-3p promovem mudanças efetivas na expressão do eIF4E.

Figura 17: Expressão do RNA mensageiro do eIF4E e genes correlatos em cardiomiócitos tratados com amiR-34c-3p e mmiR-34c-3p, ambos a concentração de 50nM. Dados em % do controle, em expressão de mRNA obtida a partir de análise de RT-PCR, com *primers* específicos para os genes. A) Expressão gênica do eIF4E. B) Expressão gênica do eIF4BP1. C) Expressão gênica do eIF4G. * $p < 0,003$ vs. controle; # $p < 0,0025$ vs. mmiR-10nM.

Para compreender de maneira ampla a interação miRNA-34c-3p-eIF4E, foi necessária a verificação das expressões de genes que, na via de HC clássica induzida pelo TFA, são modulados previamente a ativação do eIF4E, que são o eIF4G e o eIF4BP1. Como mostra a figura 17C, a expressão do RNAm do eIF4G, não foi alterada nem com a inibição nem tampouco com a superexpressão do miRNA-34c-3p. Entretanto, pode ser observada uma tendência no aumento da expressão desse gene quando o miRNA-34c-3p é aumentado ($p < 0,07$), em um possível mecanismo de *feedback* negativo quando, na necessidade de manter as funções celulares, pode haver um aumento da expressão do eIF4G na tentativa de que haja mais ligação eIF4G-eIF4E, levando ao início da tradução ribossomal, e consequente síntese proteica.

Foi analisado ainda a expressão do eIF4BP1, conforme figura 17B, quando não há evidências de alteração na expressão de seu RNAm quando o miRNA-34c-3p é alterado, seja inibindo-o ou superexpressando-o.

5.1.2.1 Validação do eIF4E como gene alvo do miRNA-34c-3p

Considerando os resultados previamente explanados, há reais indícios de que o eIF4E seja um alvo do miRNA-34c-3p, conforme análise *in silico*. O gene do eIF4E possui 2 sítios preditos de interação com o miRNA-34c-3p, ambos com pareamento perfeito, sinalizando uma facilidade na ligação gene-miRNA. Dessa forma, com o intuito de confirmar se o eIF4E é de fato um alvo do miRNA-34c-3p, foram realizados os ensaios para quantificar a atividade da luciferase a partir de um plasmídeo contendo o eIF4E ligado ao gene repórter para luciferase.

Para tanto, células CHO foram plaqueadas, e a transfecção foi conduzida seguindo os quatro grupos experimentais: o controle (transfectado apenas com o LS_eIF4E); o eIF4E mmiR-34c-3p (o plasmídeo LS_KLF11 cotransfectado com o superexpressor do miRNA-34c-3p); o controle random (transfectado apenas com o plasmídeo LS_Random); e por fim, o eIF4E random (cotransfecção do plasmídeo LS_random e mmiR-34c-3p).

Conforme mostrado na figura 18, o aumento da expressão do miRNA-34c-3p reduziu a atividade da luciferase em 48,33%. Entretanto, as transfecções com o LS_Random, com e sem mmiR-34c-3p, não produziram alterações consideráveis na luminescência. Dessa forma, temos que a ligação do miRNA-34c-3p com o eIF4E foi efetiva, o que demonstra a repressão pós-transcricional desse gene na presença do miRNA-34c-3p.

Figura 18: Validação do eIF4E como gene alvo do microRNA-34c-3p. Valores da luminescência o ligar-se à renilla presente no substrato LightSwitch, com valores corrigidos pelo normalizador interno da transfecção, a Cipridina, em ensaio de validação do eIF4E como gene alvo do miRNA-34c-3p.

Amostras do controle, eIF4E mmiR-34c-3p, controle random, Random mmiR-34c-3p respectivamente. Médias de três ensaios independentes, com barras representando erro padrão. * $p < 0,02$.

5.1.3 Diâmetro dos cardiomiócitos

Após mostrar que há uma regulação do eIF4E pelo miRNA-34c-3p, houve o questionamento acerca da hipótese de que a inibição do miRNA-34c-3p em cultura celular, causaria HC tal qual o TFA. Para tanto, foi realizado o ensaio de imunofluorescência (IF), quando as células foram fixadas com PFA 4%, 72 horas após a transfecção com amiR-34c-3p e mmiR-34c-3p. Foi adicionado o anticorpo primário para α -actinina esquelética, que está representada em verde, e, conjugado ao tampão de montagem, o DAPI, corando os núcleos celulares em azul.

Em análise qualitativa da imagem mostrada na figura 19, pode-se observar um aumento na área dos cardiomiócitos tratados com amiR-34c-3p a 50nM em relação ao controle, ao passo que aqueles tratados com mmiR-34c-3p a 50nM mostram uma manutenção com tendência a redução de seu diâmetro em relação às células controle. Essa imagem indica que há uma HC desencadeada pela inibição do miRNA-34c-3p.

Figura 19: Imunofluorescência (IF) de cardiomiócitos tratados com amiR-34c-3p ou mmiR-34c-3p. A fluorescência verde é α -actinina, que é uma proteína sarcomérica, e a fluorescência azul é DAPI que marca o núcleo das células.

5.1.4 Marcadores de Hipertrofia Cardíaca

Considerando que a inibição do miRNA-34c-3p mostrou-se eficaz na redução da expressão do eIF4E e que este processo gerou uma HC, se fez imprescindível ensaios para averiguar se HC observada por IF era fisiológica ou patológica. Para

tanto, foi feita a expressão gênica de genes marcadores de hipertrofia patológica como: α -actina esquelética, o fator natriurético atrial (ANF), e a miosina de cadeia pesada do tipo alfa (α -MCP) e do tipo beta (β -MCP), que são genes fetais reprogramados em resposta a HC patológica.

Como resposta ao tratamento com o amiR-34c-3p é possível observar uma diminuição de 6,13% em relação ao grupo controle na expressão da α -actina esquelética, sem que haja alterações na expressão quando as células foram tratadas com o mmiR-34c-3p, como mostrado na figura 20A. Já quanto à expressão do ANF, tem-se um aumento de aproximadamente 84,4% na expressão deste gene no grupo tratado com o mmiR-34c-3p, sem que houvesse diferenças significativas no grupo tratado com o amiR-34c-3p, como mostrado na figura 20B. Já na figura 20C, observa-se um aumento na ordem de 276% na expressão da α -MCP no grupo tratado com o mmiR-34c-3p em relação ao grupo controle. Por outro lado, a expressão da β -MCP foi bruscamente diminuída (66,37%) no grupo tratado com amiR-34c-3p, em relação ao grupo controle, e aumentada em 42,2% no grupo tratado com mmiR-34c-3p, como demonstrado na figura 20D. Juntos, esses resultados sugerem uma indução de quadro patológico quando os cardiomiócitos sofreram aumento do miRNA-34c-3p. Em oposição, entretanto, os dados mostram que a inibição do miRNA-34c-3p promove uma diminuição desses genes, sugerindo um quadro de HC fisiológica semelhante àqueles encontrados em respostas ao TFA.

Figura 20: Expressão de genes marcadores de hipertrofia cardíaca patológica tratados com amiR-34c-3p e mmiR-34c-3p, ambos a concentração de 50nM. Dados em % do controle, em expressão de mRNA obtida a partir de análise de RT-PCR, com *primers* específicos para os genes. A) Expressão gênica da α -actina esquelética. B) Expressão gênica do ANF. C) Expressão gênica da α -MCP. D) Expressão gênica da β -MCP. * $p < 0,007$ vs. controle; **** $p < 0,0001$ vs. controle.

5.1.5 siRNA eIF4E

Como contraprova aos tratamentos com o amiR-34c-3p e o mmiR-34c-3p, bem como da validação do eIF4E como alvo do miRNA-34c-3p, prosseguiu-se a padronização da técnica de inibição gênica através da utilização de siRNA, com a curva de concentração do oligonucleotídeos a ser utilizada nos experimentos subsequentes. Ao tratar cardiomiócitos com siRNA para o gene de interesse, o eIF4E, houve redução de expressão gênica nas três concentrações estudadas, como ilustra a figura 21A, com redução mais proeminente na concentração de 10 μ M (45%), seguido da concentração de 20 μ M (40%), se comparadas com o controle, sem que houvesse diferença entre essas duas concentrações. Os experimentos seguiram com a utilização de ambas as concentrações.

Confirmando a hipótese de que a inibição do miRNA-34c-3p levaria ao aumento da expressão do eIF4E, mesmo sob efeito do *knock-down* desse gene,

verifica-se aumento de 30% na expressão do eIF4E nas células tratadas com o siRNA eIF4E 20 μ M e com o amiR-34c-3p *a posteriori*, quando comparadas com as células tratadas unicamente com o siRNA eIF4E 20 μ M, como pode ser observado na figura 21B, levando a expressão do gene eIF4E a níveis basais. Por outro lado, a somatória dos tratamentos com inibição do eIF4E através do tratamento com siRNA e com a superexpressão do miRNA-34c-3p (mmiR-34c-3p), não foi capaz de reduzir a expressão do gene a níveis menores do que os já encontrados com a superexpressão do miRNA-34c-3p apenas.

Apesar desse fenômeno, encontra-se um aumento brusco na expressão do gene da β -MCP em ambas as concentrações de siRNA (10 e 20 μ M) combinadas com o tratamento com o mmiR-34c-3p (76% e 61%, respectivamente), denotando um perfil patológico nessas células com depleção combinada do eIF4E (Figura 21F). Em oposição a esses achados, e corroborando o discutido na figura 21B, contudo, observa-se na figura 21D que ao tratar as células com amiR-34c-3p previamente tratadas com siRNA 20 μ M, na tentativa de corrigir o possível fenótipo patológico causado pela diminuição do eIF4E, há um aumento de 319% na razão entre as expressões da α -MCP e β -MCP, em clara sugestão de remodelamento fenotípico fisiológico nessas células.

Figura 21: Expressão gênica do eIF4E e genes marcadores de hipertrofia cardíaca patológica tratados com siRNA para o eIF4E, bem como amiR-34c-3p e mmiR-34c-3p, ambos a concentração de 50nM. Dados em % do controle, em expressão de mRNA obtida a partir de análise de RT-PCR, com *primers* específicos para os genes, e expressos como média $\pm$ erro padrão. A) Expressão gênica do eIF4E, em curva de concentração do siRNA. B) Expressão do eIF4E em duas concentrações do siRNA, bem como do amiR-34c-3p ou do mmiR-34c-3p. C) Expressão gênica da α -actina esquelética. D) Razão entre a expressão gênica da α -MCP e β -MCP. E) Expressão gênica da α -MCP. F) Expressão gênica da β -MCP. * $p < 0,03$ vs. control; ** $p < 0,002$ vs. control; *** $p < 0,0001$ vs. control; ## $p < 0,003$ vs. eIF4E 10 μ M; & $p < 0,05$ vs. eIF4E 20 μ M; && $p < 0,006$ vs. eIF4E 20 μ M.

Corroborando com os dados acima discutidos, ao verificar a expressão do miRNA-34c-3p nas células com *knock-down* para o eIF4E, observa-se um aumento de 200% quando comparadas as células controle e as tratadas com 10 μ M, como ilustra a figura 22A. No mesmo sentido, há um aumento combinado entre a superexpressão do miRNA-34c-3p através do mmiR-34c-3p e do tratamento com o siRNA para o gene eIF4E, como ilustra a figura 22B.

Figura 22: Expressão do miRNA-34c-3p em cardiomiócitos tratados com siRNA para o gene eIF4E. A) Expressão do miR-34c-3p na curva de concentração do siRNA para o eIF4E. B) Expressão do miR-34c-3p nas diferentes condições entre os tratamentos com amiR-34c-3p ou mmiR-34c-3p e o siRNA. Dados em % do controle, em expressão de mRNA obtida a partir de análise de RT-PCR, com *primer* específico para o miRNA-34c-3p, e expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,01$ vs. control; ** $p < 0,001$ vs. control.

Com esses dados, conclui-se, mais uma vez, que o miRNA-34c-3p tem como gene alvo o eIF4E, seja por expressão do gene inversamente proporcional a redução ou aumento do miRNA-34c-3p, por validação através do ensaio da enzima da luciferase e, por fim, através do silenciamento do gene com consequente aumento do miRNA de interesse. Vale salientar ainda, que com esses achados, há a proposta de que a inibição exógena do miRNA-34c-3p possa atuar no aumento da expressão do eIF4E e consequente melhora no fenótipo celular, ao aumentar a razão entre genes biomarcadores da HC patológica.

5.1.6 KLF11 e genes correlatos

A partir da compreensão dos resultados previamente mostrado, tem-se que a inibição do miRNA-34c-3p promoveu uma HC fisiológica via aumento da expressão do eIF4E. Considerando que para haver um aumento do tamanho celular, uma melhora nos estímulos metabólicos deve haver em concomitância ao quadro hipertrófico. Dessa forma, como já comentado na introdução desse projeto, observou-se um aumento de 192% na expressão do KLF11 nas células tratadas com amiR-34c-3p em relação ao controle. Em concordância a este dado e aos dados de expressão gênica do miRNA-34c-3p, há uma brusca redução de 60,41% nas células tratadas com mmiR-34c-3p em relação ao grupo controle. Como também comentado previamente, validamos o KLF11 como alvo do miRNA-34c-3p, quando houve redução de 55,3% na luminescência quando analisada a ligação gene-miRNA por atividade da luciferase.

Para investigar a possível regulação do miRNA-34c-3p e seu gene alvo com outros genes envolvidos no início da via da PI3K-AKT, importantes para a translocação de Glut-4 e melhora do metabolismo oxidativo, foram analisados os substratos 1 e 2 dos receptores de insulina (IRS1 e IRS2), e o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF). Como mostrado na figura 23A, não há diferença significativa entre os grupos controle, amiR-34c-3p e mmiR-34c-3p quanto a expressão gênica do IRS1, apesar de haver uma tendência ao aumento da expressão desse gene quando as células foram submetidas ao mmiR-34c-3p, o que pode ocorrer como respostas a diminuição do KLF11.

Quando o IRS2 foi analisado, também não se observa diferenças significativas entre os grupos analisados, entretanto, mais uma vez há uma tendência ao aumento da expressão desse gene quando as células foram submetidas ao mmiR-34c-3p, como observado na figura 23B.

Quando analisada a expressão do IGF, nenhuma diferença ou quaisquer tendências são encontradas, como pode ser visto na figura 23C. Os resultados indicam, mais uma vez, que a modulação gerada pela inibição do miRNA-34c-3p produz efeitos apenas no seu gene alvo. Assim, compreendendo que o KLF11 possui ligação com mecanismos de melhora metabólica no que diz respeito a aumento de captação de glicose, foi necessário expandir os ensaios na tentativa de elucidar tais efeitos.

Figura 23: Expressão de genes correlacionados ao KLF11 em cardiomiócitos tratados com amiR-34c-3p e mmiR-34c-3p, ambos a concentração de 50nM. Dados em % do controle, em expressão de mRNA obtida a partir de análise de RT-PCR, com *primers* específicos para os genes. A) Expressão gênica da IRS1. B) Expressão gênica do IRS2. C) Expressão gênica do IGF. D) Expressão gênica da AKT.

5.1.7 Dosagem de Glicose

Para testar a hipótese de que o KLF11 está envolvido com a translocação de Glut-4, e consequentemente com o aumento da captação de glicose, foi realizada a quantificação da glicose do meio de cultura celular, após 72 horas de transfecção com amiR-34c-3p. Ao diminuir o miRNA-34c-3p, há uma diminuição de 12,31% ($p < 0,04$) no grupo tratado com o amiR-34c-3p em relação ao controle, como ilustrado na figura 24, mostrando que, como efeito da inibição do miRNA-34c-3p, há um aumento na expressão do KLF11, gerando um aumento na captação de glicose por essas células.

Figura 24: Quantificação da glicose, no meio de cultura celular, após 48 horas da transfecção, por ACCU-CHEK Performa. Houve diminuição de 12,31% no grupo tratado com amiR-34c-3p em relação ao controle. * $p < 0,04$.

5.1.8 siRNA KLF11

Assim como na utilização do siRNA para o gene eIF4E, como contraprova aos tratamentos com o amiR-34c-3p e o mmiR-34c-3p, bem como da validação do KLF11 como alvo do miRNA-34c-3p, foi realizada a curva de concentração do oligonucleotídeo a ser utilizada nos experimentos subsequentes. Ilustra a figura 25A a redução de 12 e 16% quando as células foram tratadas com siRNA para o KLF11 nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M, respectivamente, se comparadas com os cardiomiócitos controle. Não houve diferença entre estas concentrações.

Na figura 25B é possível se observar um aumento de 20% na expressão do KLF11 em células tratadas com amiR-34c-3p após *knock-down* do KLF11 através do silenciamento gênico.

Apesar desses dados promissores, não foi possível verificar qualquer melhora nos biomarcadores genes de HC patológica, havendo a necessidade de aumento do número de experimentos independentes. Contudo, é possível verificar tendência na diminuição da razão na expressão dos genes de α -MCP e β -MCP, acompanhada de tendência ao aumento da expressão da β -MCP ambas nos grupos com cotratamento de siRNA para o KLF11 e superexpressão do miRNA-34c-3p através do mmiR-34c-3p, em convergência a hipótese de que essa combinação levaria a um aumento nos marcadores de HC patológica (Figuras 25D e 25F).

Figura 25: Expressão gênica do KLF11 e genes marcadores de hipertrofia cardíaca patológica tratados com siRNA para o KLF11, bem como amiR-34c-3p e mmiR-34c-3p, ambos a concentração de 50nM. Dados em % do controle, em expressão de mRNA obtida a partir de análise de RT-PCR, com *primers* específicos para os genes. A) Expressão gênica do KLF11, em curva de concentração do siRNA. B) Expressão do KLF11 em duas concentrações do siRNA, bem como do amiR-34c-3p ou do mmiR-34c-3p. C) Expressão gênica da α -actina esquelética. D) Razão entre a expressão gênica da α -MCP e β -MCP. E) Expressão gênica da α -MCP. F) Expressão gênica da β -MCP. * $p < 0,01$ vs. control; *** $p < 0,0001$ vs. control; & $p < 0,05$ vs. KLF11 20 μ M.

Investigando a expressão do miRNA-34c-3p nas células com *knock-down* para o KLF11, observa-se um aumento de 200% quando comparadas as células

controle e as tratadas com 10 μ M, como ilustra a figura 26A. A combinação dos tratamentos, entretanto, não aumentou a expressão do miRNA-34c-3p, como ilustrado na figura 26B.

Figura 26: Expressão do miRNA-34c-3p em cardiomiócitos tratados com siRNA para o gene KLF11. A) Expressão do miRNA-34c-3p na curva de concentração do siRNA para o KLF11. B) Expressão do miRNA-34c-3p nas diferentes condições entre os tratamentos com amiR-34c-3p ou mmiR-34c-3p e o siRNA. Dados em % do controle, em expressão de mRNA obtida a partir de análise de RT-PCR, com *primer* específico para o miRNA-34c-3p, e expressos como média $\pm$ erro padrão. *** $p < 0,0001$ vs. control.

5.2 Caracterização dos Animais submetidos ao Treinamento Físico Aeróbio e seus controles

5.2.1 Peso Corporal e Glicemia

Após finalizar os estudos-piloto (Apêndice A), animais com 45 dias foram divididos nos 4 grupos experimentais, identificados e acondicionados de forma que os animais conviviam apenas com aqueles de mesmo grupo experimental.

A figura 27A mostra a progressão do peso corporal (PC) dos grupos desde a semana -2 (animais com 45 dias), quando houve a indução à DM ou aplicação do tampão citrato, até o findar do protocolo de TFA. Os animais dos 4 grupos não apresentavam diferença de PC quando houve a randomização dos mesmos entre diabéticos e euglicêmicos. Entretanto, é possível observar que desde a primeira

semana pós-indução (semana -1), os animais que receberam a STZ já demonstraram um aumento de PC mais ameno do que os animais euglicêmicos, tendo essa progressão se mantido em escala mais reduzida ao longo de todo o protocolo. É importante também salientar que o aumento quase exponencial entre a semana -1 e 0 se dá pelo período de maturação do animal. Na semana 0, tivemos os animais com 60 dias de vida, quando estes atingem a maturação biológica.

Já na figura 27B, pode-se ver que não houve diferença do PC no início do protocolo entre os grupos. Entretanto, ao final do protocolo foi observado um aumento menos expressivo do grupo ET em relação ao grupo ES (Pós ES: $436,34 \pm 10,26$ g; Pós ET: $393,38 \pm 24,36$ g), e uma manutenção do PC do grupo DT em relação ao ES e ao DS, com aumento significativo do PC do grupo DS em relação ao seu PC inicial (Pós DS: $326,99 \pm 17,46$ g; Pós DT: $317,60 \pm 10,98$ g). A literatura mostra resultados destoantes em relação ao PC frente ao TFA, devido às diferentes naturezas dos protocolos, bem como heterogeneidade entre frequência, intensidade e duração do exercício proposto. Levando isto em consideração, os estudos que encontram diminuição ou mesmo um ganho mais abreviado do PC pós TFA, discutem esse achado ao aumento do metabolismo basal devido a um aumento no gasto calórico, com principal ativação do metabolismo oxidativo, quando há, principalmente, uma redução do tecido adiposo desses animais (93).

Figura 27: Peso corporal dos animais. A) Peso Corporal ao longo das semanas de indução à DM e de treinamento. B) Peso Corporal Pré e Pós TFA. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. *** $p < 0,0002$ vs. ES Pré TFA; **** $p < 0,0001$ vs. ES Pré TFA; # $p < 0,01$ vs. DS Pré TFA.

Ao randomizarmos os animais, decorreu-se o processo de indução à DM através da aplicação de STZ intraperitoneal. Para assegurarmos a instauração da doença, monitoramos a glicemia em vários pontos até o início do protocolo de TFA. Como pode-se observar na figura 28, após a aplicação da STZ, houve uma resposta muito semelhante entre os grupos DS e DT, sem que houvesse diferença entre as medidas adquiridas.

Em resposta ao TFA, não houve diferenças entre os grupos treinados e seus respectivos controles. Entretanto, como já esperado, houve diferença bastante significativa entre os grupos euglicêmicos e diabéticos (Pós ES: $120 \pm 4,52$ mg/dL; Pós ET: $109 \pm 3,43$ mg/dL; Pós DS: $526,11 \pm 44,88$ mg/dL; Pós DT: $508,13 \pm 19,25$ mg/dL).

Figura 28: Glicemia medida através de aparelho ACCU-CHEK Performa. A) Glicemia após indução à DM e de treinamento. B) Glicemia Pré e Pós TFA. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. **** $p < 0,0001$ vs. ES e ET.

5.2.2 Gaiola Metabólica

Com o intuito de melhor monitorar o metabolismo dos animais, considerando as implicações já conhecidos da DM em diversos sistemas do organismo, em especial no urinário, com efeitos diretos no sistema cardiovascular, seguimos com a análise em gaiola metabólica. Em todos os parâmetros avaliados (volume de água consumido, quantidade de ração consumida, volume urinário e excrementos) não foi possível observar efeitos do TFA. Entretanto, entre todos os parâmetros houve um aumento abrupto em consumo e excrementos nos grupos diabéticos em relação aos grupos euglicêmicos. Na figura 29A, observa-se um aumento bastante significativo no

consumo de água nos animais diabéticos (Pós ES: $25,00 \pm 4,77\text{mL}$; Pós ET: $26,67 \pm 3,41\text{mL}$; Pós DS: $124,67 \pm 18,10\text{mL}$; Pós DT: $127,43 \pm 17,81\text{mL}$). Observa-se na figura 29B aumento no consumo de ração (Pós ES: $17,04 \pm 1,82\text{g}$; Pós ET: $20,83 \pm 1,44\text{g}$; Pós DS: $31,90 \pm 3,18\text{g}$; Pós DT: $38,12 \pm 2,39\text{g}$). Considerando o aumento consumo de água, resposta esperando frente a exacerbada glicemia dos animais diabéticos, o volume de urina excretada em 24 horas também foi bastante acentuado, como mostrado na figura 29C (Pós ES: $17,00 \pm 2,68\text{mL}$; Pós ET: $11,33 \pm 1,20\text{mL}$; Pós DS: $111,60 \pm 20,34\text{mL}$; Pós DT: $110,71 \pm 16,46\text{mL}$). No mesmo sentido, houve um aumento no peso, correlacionando com o volume, das fezes excretadas pelos animais dos dois grupos diabéticos em relação aos euglicêmicos, como ilustrado na figura 29D (Pós ES: $5,96 \pm 1,40\text{g}$; Pós ET: $5,00 \pm 0,78\text{g}$; Pós DS: $16,83 \pm 1,76\text{g}$; Pós DT: $11,59 \pm 1,35\text{g}$).

Nas figuras 29E e 29F, pode-se concluir que, uma vez que o PC dos animais diabéticos é, em geral, menor do que os dos animais euglicêmicos, que os pesos inicial e final são inferiores aos animais dos grupos ES e ET. De forma curiosa, entretanto, o delta feito entre o peso final e o inicial demonstra que os animais diabéticos submetidos ao protocolo de TFA, perderam menos peso ao longo das 24 horas em que estiveram monitorados na gaiola metabólica, sugerindo que o TFA pode ser melhorado o quadro global no balanço ingestão-gasto, ou ainda, levantar hipóteses sobre o efeito do TFA na melhora da captação de nutrientes, uma vez que os animais DT pós-TFA tiveram uma tendência de aumento na ingestão de ração, com tendência na queda do peso das fezes, e uma perda de PC também reduzida, como ilustrado na figura 29F e 29G (Pós ES: $-3,10 \pm 2,28\text{g}$; Pós ET: $1,73 \pm 5,09\text{g}$; Pós DS: $0,02 \pm 1,64\text{g}$; Pós DT: $18,06 \pm 5,37\text{g}$).

Figura 29: Registros adquiridos a partir de permanência de 24 horas em gaiola metabólica. A) Água consumida em mililitros. B) Ração consumida em gramas. C) Volume urinado em mililitros. D) Peso de fezes em gramas. E) Peso Corporal ao início do período de 24 horas, medido em gramas. F) Peso Corporal ao término do período de 24 horas, medido em gramas. F) Delta do Peso Corporal entre início e final do período dentro da gaiola metabólica. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. ** $p < 0,001$ vs. ES Pré TFA; *** $p < 0,002$ vs. ES Pré TFA; **** $p < 0,0001$ vs. ES e ET; & $p < 0,01$ vs. ET Pré TFA; && $p < 0,006$ vs. ET Pré TFA; # $p < 0,03$ vs. DS.

5.2.3 Parâmetros Bioquímicos

Ainda na busca de melhor caracterizar os animais diabéticos submetidos ao TFA, ao analisar o soro dos animais ao final do protocolo, observa-se uma diferença de resultados na glicemia, quando comparada com a medida com os animais ainda vivos através de fita reativa. Como visto na figura 30A, os animais dos dois grupos diabéticos, de fato, têm uma glicemia exacerbada quando comparados aos animais euglicêmicos. Porém, através dessa análise, há um aumento significativo na glicemia dos animais do grupo DT (Pós ES: $188,9 \pm 11,70$ mg/dL; Pós ET: $201,70 \pm 17,21$ mg/dL; Pós DS: $444,3 \pm 12,99$ mg/dL; Pós DT: $519,9 \pm 13,24$ mg/dL).

Figura 30: Glicemia e lactato medida através do Analisador Bioquímico Automático Labmax 240, no soro dos animais pós protocolo de TFA. A) Glicemia após as 10 semanas de TFA. B) Lactato em soro pós TFA. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. **p<0,0001 vs. ES Pós TFA; #p<0,01 vs. DS Pós TFA; ##p<0,002.**

Observa-se na figura 30B que o TFA parece ter sido eficiente na restauração dos níveis de lactato no soro dos animais diabéticos, quando comparado com os animais diabéticos sedentários (Pós ES: $88,89 \pm 8,52$ mg/dL; Pós ET: $94,50 \pm 12,98$ mg/dL; Pós DS: $63,67 \pm 3,49$ mg/dL; Pós DT: $101,3 \pm 8,85$ mg/dL). Este resultado pode ser importante no que diz respeito ao metabolismo cardíaco, uma vez que se sabe que este tecido é capaz de utilizar o lactato como fonte energética, tal qual o fígado.

Já quanto às análises de colesterol, na figura 31A, observa-se um aumento significativo no colesterol HDL em ambos os grupos diabéticos em comparação ao grupo euglicêmico sedentário, sem que houvesse interferência do TFA (Pós ES: $23,00 \pm 0,93$ mg/dL; Pós ET: $19,67 \pm 0,99$ mg/dL; Pós DS: $28,11 \pm 1,09$ mg/dL; Pós DT: $29,00 \pm 1,39$ mg/dL). Sobre o colesterol LDL, apesar de haver uma tendência, já esperada,

na diminuição de seus níveis em animais treinados, essa premissa somente se concretizou no caso dos animais euglicêmicos, quando comparado aos ES (Pós ES: $6,22 \pm 0,70$ U/L; Pós ET: $4,33 \pm 0,21$ U/L; Pós DS: $6,56 \pm 0,73$ U/L; Pós DT: $6,63 \pm 0,77$ U/L), como ilustrado na figura 31B. Este dado se contrapõe ao que se esperava: uma diminuição no colesterol HDL, com aumento do colesterol LDL.

Figura 31: Colesterol HDL, LDL e Total e Triglicérides medidos através do Analisador Bioquímico Automático Labmax 240, no soro dos animais pós protocolo de TFA. A) Colesterol HDL. B) Colesterol LDL. C) Colesterol Total. D) Triglicérides. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão, e medidos em mg/dL, com exceção do LDL, medido em U/L. * $p < 0,007$ vs. ES Pós TFA; ** $p < 0,003$ vs. ES Pós TFA.

Seguindo os dados obtidos com o colesterol LDL, na figura 31C pode-se observar uma diminuição no colesterol total nos animais euglicêmicos treinados, quando comparados aos euglicêmicos sedentários, o que não se reflete nos animais diabéticos treinados (Pós ES: $73,00 \pm 5,87$ mg/dL; Pós ET: $51,67 \pm 2,11$ mg/dL; Pós DS: $79,22 \pm 2,66$ mg/dL; Pós DT: $76,13 \pm 3,26$ mg/dL). A figura 31D ilustra os dados de triglicérides, quando não houveram diferenças entre os grupos (Pós ES: $145,60 \pm 16,99$ mg/dL; Pós ET: $125,00 \pm 16,76$ mg/dL; Pós DS: $160,9 \pm 18,09$ mg/dL; Pós DT: $135,10 \pm 14,70$ mg/dL).

Na investigação das consequências sistêmicas da instauração da DM nos animais, observa-se aumento nas concentrações de ureia nos animais diabéticos,

quando comparado com os animais euglicêmicos, como visto na figura 32A. Ao comparar os grupos diabéticos sedentário e treinado, observa-se uma diminuição na concentração da ureia como efeito do TFA, retornando aos níveis basais (Pós ES: $68,78 \pm 2,03\text{mg/dL}$; Pós ET: $60,83 \pm 2,37\text{mg/dL}$; Pós DS: $86,44 \pm 3,52\text{mg/dL}$; Pós DT: $75,38 \pm 1,46\text{mg/dL}$). Em consonância com esse resultado, a concentração de creatinina também se encontra aumentada no grupo diabético sedentário, e tem sua concentração diminuída retornando aos níveis basais frente ao TFA (Pós ES: $0,38 \pm 0,01\text{mg/dL}$; Pós ET: $0,32 \pm 0,01\text{mg/dL}$; Pós DS: $0,48 \pm 0,03\text{mg/dL}$; Pós DT: $0,43 \pm 0,02\text{mg/dL}$), como ilustrado na figura 32B. Esses dados, analisados em conjunto, e acompanhados dos dados já demonstrados de volume urinário e ingestão de água, indicam que há a possibilidade dos animais diabéticos sedentários já estarem com doença renal crônica, e que o TFA foi eficiente em atenuar esses parâmetros.

Figura 32: Ureia, Creatinina e Ácido Úrico medidos através do Analisador Bioquímico Automático Labmax 240, no soro dos animais pós protocolo de TFA. A) Ureia. B) Creatinina K. C) Ácido Úrico. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão, e medidos em mg/dL. * $p < 0,0001$ vs. ES Pós TFA; # $p < 0,02$ vs. DS Pós TFA; & $p < 0,005$ vs. ET Pós TFA.**

Na figura 32C, observa-se uma pequena tendência no aumento da concentração do ácido úrico frente ao TFA em ambos os grupos, euglicêmico e diabético (Pós ES: $1,25 \pm 0,18\text{mg/dL}$; Pós ET: $1,59 \pm 0,37\text{mg/dL}$; Pós DS: $0,80 \pm 0,02\text{mg/dL}$; Pós DT: $1,30 \pm 0,15\text{mg/dL}$). É sabido que índices mais elevados, mais

ainda dentro da normalidade, do ácido úrico podem ter efeitos anti-oxidantes e, consequentemente protetores para o sistema cardiovascular, motivo pelo o qual o TFA pode ter gerado efeitos benéficos nesse tênue aumento.

5.3 Marcadores de Treinamento

Considerando o caráter crônico do protocolo de TFA sugerido nesse estudo, análises para sustentar a eficácia do TFA em modular parâmetros cardiopulmonares e de melhora no metabolismo aeróbio dos animais, bem como possíveis alterações no peso dos tecidos foram sugeridas e serão apresentadas a seguir.

5.3.1 Parâmetros Hemodinâmicos

Os parâmetros hemodinâmicos são de extrema valia na caracterização dos efeitos do TFA ao sistema cardiovascular, consistindo em um ótimo parâmetro funcional para garantir a eficácia do TFA. Como esperado, e em consonância com os demais estudos do grupo, bem como os dados apresentados na literatura, frente ao TFA houve redução na frequência cardíaca de repouso tanto nos animais euglicêmicos quanto nos animais diabéticos, em 77 e 83 batimentos por minuto respectivamente, como ilustra a figura 33A (ES: $465 \pm 31,49$ bpm; ET: $388 \pm 3,06$ bpm; DS: $462 \pm 12,3$ bpm; DT: $383 \pm 4,33$ bpm).

Em congruência a esses dados, na figura 33B encontra-se que a pressão arterial sistólica também sofreu redução frente ao estímulo fisiológico do TFA, com redução de 17 e 20 milímetros de mercúrio (mmHg), respectivamente, quando comparados os grupos ET ou DT ao ES (ES: $147,06 \pm 6,03$ mmHg; ET: $129,94 \pm 1,54$ mmHg; DS: $141,87 \pm 3,76$ mmHg; DT: $126,63 \pm 1,88$ mmHg).

Já na figura 33C, percebe-se que o resultado supracitado se mantém, quando o TFA também foi capaz de reduzir, ainda que em menor magnitude, como esperado, a pressão arterial diastólica, reduzindo 15mmHg no grupo ET, e 13mmHg no grupo DT, ao serem comparados com o ES (ES: $116,71 \pm 2,23$ mmHg; ET: $101,33 \pm 4,82$ mmHg; DS: $120,89 \pm 3,47$ mmHg; DT: $103,88 \pm 2,06$ mmHg).

Com o exposto, assegura-se que houve bradicardia frente ao protocolo de TFA, bem como redução da pressão arterial nos animais treinados, em detrimento àqueles que permaneceram sedentários.

Figura 33: Análise dos parâmetros hemodinâmicos dos animais pós protocolo de TFA. A) Frequência cardíaca de Repouso, expressa em batimentos por minuto (bpm). B) Pressão arterial sistólica. C) Pressão arterial diastólica. D) Pressão arterial média. As pressões foram expressão em milímetros de mercúrio (mmHg). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão, e medidos em mg/dL. * $p < 0,01$ vs. ES; ** $p < 0,007$; # $p < 0,01$ vs. DS; ## $p < 0,001$ vs. DS.

5.3.2 Teste de esforço físico máximo

Outro importante parâmetro utilizado para comprovar a eficácia do protocolo de TFA imposto aos animais foi o teste de esforço físico máximo. Os animais foram submetidos a esse teste em esteira rolante até a exaustão no início e no final do protocolo de TFA de natação. Neste momento é importante ressaltar que, apesar do caráter não específico do exercício praticado nesse teste, este permite a observação de indícios importantes da melhora da capacidade máxima de realização de esforço físico aeróbio, como melhora do metabolismo oxidativo e cardiopulmonar, como já comentado.

Através desse teste, pode-se extrair dados de distância (em metros), tempo (em minutos) e velocidade máxima atingida (em m/min). Nos três parâmetros analisados, notou-se a eficácia do TFA, com aumento expressivo nos parâmetros entre os grupos ET e DT pós o TFA, quando comparado aos testes iniciais pré TFA. Na figura 34A, encontra-se a ilustração dos dados de distância (Pós ES: $559,34 \pm 55,51\text{m}$; Pós ET: $981,53 \pm 107,45\text{m}$; Pós DS: $604,9 \pm 56,89\text{m}$; Pós DT: $891,74 \pm 15,52\text{m}$). Já na figura 34B, encontra-se o tempo de permanência dos animais no teste (Pós ES: $29,12 \pm 0,28\text{min}$; Pós ET: $39,40 \pm 2,31\text{min}$; Pós DS: $30,11 \pm 1,47\text{min}$; Pós DT: $37,48 \pm 1,21\text{min}$). Por fim, na figura 34C, tem-se a velocidade máxima atingida, momento em que os animais entraram em exaustão física (Pós ES: $32,00 \pm 0,50\text{m/min}$; Pós ET: $43,00 \pm 2,53\text{m/min}$; Pós DS: $33,00 \pm 1,87\text{m/min}$; Pós DT: $40,88 \pm 1,38\text{m/min}$).

Figura 34: Teste de esforço físico máximo. Distância Percorrida (A), Tempo (B) e Velocidade (C) Pré e Pós TFA. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão. ** $p < 0,005$ vs. ES Pré TFA; *** $p < 0,0005$ vs. ES Pré TFA; **** $p < 0,00005$ vs. ES Pré TFA.

5.3.3 Atividade da enzima Citrato Sintase

A enzima oxidativa citrato sintase presente na mitocôndria do tecido, tem importante função no ciclo de Krebs, com papel fundamental na condensação do acetato (contendo acetil-CoA) com o oxaloacetato. Com isso posto, o aumento da atividade dessa enzima figura como um bom indicativo da melhora do metabolismo aeróbio frente ao estímulo do TFA. Na figura 35, nota-se o aumento da atividade da citrato sintase no ventrículo esquerdo dos animais treinados, sejam os euglicêmicos ou os diabéticos, quando comparado com seus controles (Pós ES: $108,4 \pm 5,67$; Pós ET: $138,70 \pm 5,76$; Pós DS: $103,90 \pm 4,57$; Pós DT: $131,80 \pm 5,03$; medidas em nmol. min⁻¹. mg proteína⁻¹).

Figura 35: Atividade da enzima citrato sintase no ventrículo esquerdo representada em valores de nmol. min⁻¹. mg de proteína⁻¹. Resultados expressos como média ± erro padrão. **p<0,005 vs. ES; ##p<0,003 vs. DS.

5.3.4 Diâmetro dos cardiomiócitos

A HC fisiológica em resposta ao TFA também foi mensurada através do diâmetro dos cardiomiócitos. Na figura 36, é possível observar que houve um aumento de 6,5% no grupo ET, e de 13% no grupo DT quando comparados com o grupo ES. Houve ainda diferença entre os grupos DS e DT, em resposta ao TFA.

Figura 36: Diâmetro de cardiomiócitos analisados por cortes histológicos corados através de técnica HE. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,03$ vs. ES; ** $p < 0,009$ vs. ES; *** $p < 0,0005$ vs. ES; & $p < 0,04$ vs. DS.

5.3.5 Peso dos tecidos

Um dos parâmetros também considerados para relatar a eficácia de um protocolo de TFA é hipertrofia cardíaca. Uma das ferramentas utilizadas para se relatar essa HC é através do aumento do peso do ventrículo esquerdo. Na figura 37, mostra-se que há uma tendência no aumento do peso do VE corrigido pelo comprimento da tíbia dos animais euglicêmicos treinados em comparação aos sedentários (Pós ES: $19,20 \pm 0,85\text{mg/mm}$; Pós ET: $21,35 \pm 1,41\text{mg/mm}$; Pós DS: $18,58 \pm 0,53\text{mg/mm}$; Pós DT: $19,14 \pm 0,90\text{mg/mm}$).

Figura 37: Peso da musculatura de 3 segmentos do tecido cardíaco. O peso dos tecidos foi corrigido pelo comprimento da tíbia. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão.

Quando analisados os pesos corrigidos pelo comprimento da tíbia de três músculos esqueléticos, tem-se que tanto o músculo plantar quanto o gastrocnêmio sofreram atrofia frente à DM. Considerando o tipo de estímulo gerado com o TFA de natação, de fato não se almejava que este fosse eficiente em reverter o quadro atrofico, tal qual os dados relatam na figura 38. O sóleo teve como variáveis Pós ES: $5,20 \pm 1,31\text{mg/mm}$; Pós ET: $6,78 \pm 2,28\text{ mg/mm}$; Pós DS: $3,64 \pm 0,16\text{mg/mm}$; Pós DT: $3,38 \pm 0,41\text{mg/mm}$. Já o plantar teve como variáveis Pós ES: $10,05 \pm 0,39\text{mg/mm}$; Pós ET: $9,44 \pm 0,57\text{mg/mm}$; Pós DS: $8,22 \pm 0,42\text{mg/mm}$; Pós DT: $7,14 \pm 0,24\text{mg/mm}$. Por fim, o gastrocnêmio teve como variáveis Pós ES: $53,81 \pm 0,94\text{mg/mm}$; Pós ET: $51,86 \pm 2,36\text{mg/mm}$; Pós DS: $39,79 \pm 1,94\text{mg/mm}$; Pós DT: $38,27 \pm 2,09\text{mg/mm}$.

Figura 38: Peso da musculatura esquelética. O peso dos tecidos foi corrigido pelo comprimento da tíbia. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p<0,01$ vs. ES; **** $p<0,0001$ vs. ES; && $p<0,004$ vs. ET.

Na figura 39, mostra-se o peso das vísceras nos 4 grupos experimentais. Com relação ao pâncreas, fígado e pulmão, como esperado, não se observou diferenças. Já quanto à gordura, os animais diabéticos demonstraram uma diminuição exacerbada comparando com os animais euglicêmicos, como esperado (Pós ES: $191,50 \pm 23,45\text{mg/mm}$; Pós ET: $145,60 \pm 53,63\text{mg/mm}$; Pós DS: $60,88 \pm 33,41\text{mg/mm}$; Pós DT: $17,47 \pm 04,18\text{mg/mm}$). É de suma relevância relatar que esse dado reflete claramente a baixa no peso corporal dos animais diabéticos, já descrito ao longo desse estudo, e o estado de visível caquexia tanto da musculatura esquelética quanto adiposa.

Figura 39: Peso de vísceras. O peso dos tecidos foi corrigido pelo comprimento da tíbia. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. *** $p < 0,003$ vs. ES; **** $p < 0,0001$ vs. ES; & $p < 0,02$ vs. ET; &&& $p < 0,0008$ vs. ET.

Ainda na figura 39, nota-se um aumento no peso dos rins dos animais diabéticos (Pós ES: $58,91 \pm 1,23 \text{ mg/mm}$; Pós ET: $57,89 \pm 1,93 \text{ mg/mm}$; Pós DS: $80,02 \pm 2,89 \text{ mg/mm}$; Pós DT: $69,02 \pm 6,11 \text{ mg/mm}$). Esse dado, já esperado, tem como prováveis causas a hipertrofia glomerular, bem como o espessamento da membrana basal glomerular, ambas causadas pela hiperfiltração glomerular, sintomas da DM tipo I. Esse dado, corroborando com os dados bioquímicos de ureia e creatinina, reafirmam a hipótese de instauração de doença crônica renal.

5.3.6 Marcadores de Hipertrofia Cardíaca Patológica

Além dos parâmetros de eficácia TFA no que tange os aspectos oxidativos e cardiopulmonares já demonstrados, na figura 40 é possível observar a expressão relativa de mRNA que estão relacionados com a HC patológica. Quando analisada, a figura 40A apresenta uma diminuição da expressão da α -actina esquelética nos grupos diabéticos sedentário e treinado, quando comparados com o grupo ES (DS: 56,97%; DT: 59,48%). Ao observar o gene ANF, houve diminuição no grupo euglicêmico treinado (ET: 49,17%). Já quando avaliada a razão entre α -MCP e β -MCP, encontrou-se um aumento no grupo ET comparado com o seu controle, ES (60%), bem como aumento no grupo DT em relação ao seu controle DS (42%).

Figura 40: Expressão de marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca por RT-PCR. A) Expressão gênica α-actina esquelética, ANF (Fator Natriurético Atrial) e razão entre α-MCP e β-MCP (Miosina de Cadeira Pesada dos tipos alfa e beta). B) Expressão da α-MCP e β-MCP. Resultados expressos como média ± erro padrão. ** $p < 0,001$ vs. ES; *** $p < 0,0002$ vs. ES; **** $p < 0,0001$ vs. ES; # $p < 0,01$ vs. DS; ### $p < 0,0007$ vs. DS.

Na figura 40B, nota-se diminuição da expressão da α-MCP no grupo diabético sedentário em relação aos euglicêmicos, bem como aumento na expressão desse gene no grupo DT em relação ao DS. Já quanto a β-MCP, houve diminuição na expressão desse gene no grupo ET em comparação com o ES.

Além desses genes, foram analisadas as expressões dos genes do colágeno 1A1 e 3A1, bem como da metaloproteinase 2, sem que diferenças surgissem, como visto na figura 41. Com esses resultados, sugere-se, mais uma vez, que o protocolo

de TFA teve eficácia em promover melhoras na capacidade oxidativa do tecido cardíaca, bem como de promover melhoras em parâmetros bioquímicos em tecidos diretamente atingidos pela DM.

Figura 41: Expressão de marcadores de fibrose cardíaca por RT-PCR. Expressão gênica de colágeno 1A1 e 3A1 (COL1A1 e COL3A1), bem como de metaloproteinase do tipo 2 (MMP2). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão.

5.4 microRNA-34c-3p e Hipertrofia Cardíaca

Com o exposto até o momento, especula-se que, uma vez que há indicativos de melhora na capacidade oxidativa, com possível HC a ser avaliada por histologia, passou-se às análises gênicas de miRNA e genes-alvos. Na figura 42, é possível se observar uma redução de 23% na expressão relativa do miRNA-34c-3p no grupo ET quando comparado com o grupo ES. Em alinhamento a isto, houve uma redução de 26,6% na expressão desse miRNA no grupo DT quando comparado com o grupo DS. Esses dados corroboram com os dados previamente obtidos por *microArray*, bem como com os dados obtidos em cultura celular, quando, frente ao estímulo da inibição do miRNA-34c-3p há um fenótipo de HC fisiológica nos cardiomiócitos, sendo agora o caminho inverso, o estímulo fisiológico gerando a inibição do miRNA-34c-3p.

Figura 42: Expressão do miRNA-34c-3p em VE por RT-PCR. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,03$ vs. ES; # $p < 0,04$ vs. DS.

Com esse resultado, analisou em sequência os gene-alvos do miRNA-34c-3p validados nesse estudo. Na figura 43A, indo de encontro com o esperado, não houve diferenças nos grupos treinados, apesar de haver uma tendência no aumento da expressão desse gene frente ao TFA. Por outro lado, como ilustrado na figura 43B, parece que a DM foi capaz de promover aumento na expressão do eIF4BP1 quando comparado com os animais euglicêmicos (DS: 26% vs. ES; DT: 23 vs. ES). Já na figura 43C, não há diferenças entre os grupos experimentais quando analisada a expressão do eIF4G.

Figura 43: Expressão de genes eIF4E e correlatos por RT-PCR, em VE. A) Expressão gênica do eIF4E. B) Expressão gênica do eIF4BP1. C) Expressão gênica do eIF4G. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,04$ vs. ES.

Continuando a investigação sobre possíveis melhoras na via canônica de HC fisiológica no tecido cardíaco, foram analisados genes de relevância, como o da PI3KR2. Na figura 44A, nota-se um aumento na expressão desse gene apenas no grupo DS (15%), sem que houvesse diferença na expressão da AKT entre os grupos, como ilustrado na figura 44B. Já sobre o gene da mTOR, há um aumento de 23,4% no grupo euglicêmico treinado, e de 22,7% no grupo diabético treinado quando comparados ao grupo euglicêmico sedentário, como ilustra a figura 44C.

Figura 44: Expressão de genes da via AKT-mTOR de hipertrofia cardíaca por RT-PCR, em VE. A) Expressão gênica da PI3KR2. B) Expressão gênica da AKT. C) Expressão gênica da mTOR. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,03$ vs. ES; & $p < 0,007$ vs. ET; ### $p < 0,0002$ vs. DS.

5.5 microRNA-34c-3p e Genes Metabólicos

Compreendo que nas investigações *in vitro* frente à inibição do miRNA-34c-3p houve uma resposta em variantes metabólicas, a investigação também foi dada no sentido de tentar desvendar os possíveis genes diretamente alterados pelo miRNA-

34c-3p envolvidos nessas modulações, quando o gene do KLF11 passou a ser desbravado. Em consonância com os resultados obtidos em cardiomiócitos, o TFA, ao modular o miRNA-34c-3p negativamente, também foi capaz de aumentar a expressão gênica do KLF11 em 15,3% no grupo euglicêmico treinado e de 114,6% no grupo diabético treinado quando comparados com o grupo euglicêmico sedentário, como se nota na figura 45A. Ainda, observa-se um aumento de 68,2% no grupo diabético treinado quando comparado ao diabético sedentário. Nessa análise ainda desperta a curiosidade o fato da DM ter aumentado a expressão desse gene. Especula-se que seja devido a possível ligação desse gene com o gene da insulina, mas essa prerrogativa ainda carece de dados.

Figura 45: Expressão de genes KLF11 e correlatos por RT-PCR, em VE. A) Expressão gênica do KLF11. B) Expressão gênica do Glut-4. C) Expressão gênica do IRS1. D) Expressão gênica do IRS2. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,03$; ** $p < 0,002$ vs. ES; **** $p < 0,0001$; # $p < 0,04$; ### $p < 0,005$ vs. DS.

Como consequência desse resultado, tem-se também um aumento na expressão do gene do Glut-4 no grupo diabético treinado quando comparado com o grupo diabético sedentário (23,6%), como ilustrado na figura 45B, mas ressalta-se que o TFA não restaurou a níveis basais a expressão desse gene, que se mostrou diminuído em 52% no grupo diabético sedentário e em 28,4% no grupo diabético treinado quando comparado com o grupo euglicêmico sedentário. Há tendência no

aumento da expressão desse gene no grupo euglicêmico treinado (ET: 19% vs. ES). Ao investigar a expressão do gene IRS1, como apresenta a figura 45C, não se encontrou diferenças entre os grupos. Já na figura 45D, nota-se aumento na expressão do gene do IRS2 em ambos os grupos diabéticos quando comparados com os grupos euglicêmicos, mostrando influência da DM, mas não do TFA (DS: 44,6% vs. ES; DT: 40,6 vs. ES).

6 Potencial Terapêutico da inibição do miRNA-34c-3p: Estudo 2

Com os dados obtidos e durante discussão no exame de qualificação dessa dissertação, sugeriu-se que o foco do trabalho fosse debruçado no sentido da confirmação da modulação do miRNA-34c-3p frente a estímulos patológicos no coração, bem como no potencial terapêutico da inibição do miRNA-34c-3p frente ao estímulo do TFA.

Desse modo, foi formulada a hipótese de que as diferentes cardiopatias gerariam um aumento na expressão do miRNA-34c-3p, com consequente redução na expressão dos seus genes alvo, eIF4E e KLF11. Ainda, que o TFA poderia ser uma importante terapia não farmacológica, reduzindo a expressão do miRNA-34c-3p, e aumento dos seus genes alvos.

Para isto, em colaboração com a Professora Doutora Christiane Malfitano, foi possível proceder a análise gênica de VE de animais diabéticos e infartados. Ainda, em colaboração no próprio grupo, foi possível analisar os prováveis efeitos terapêuticos do TFA em animais infartados, utilizando-se as amostras de VE adquiridas durante o processo de doutoramento do Doutor Stéphanio Melo.

6.1 Animais Diabéticos e Infartados

Para esta análise, foram utilizados ratos divididos em seis grupos: Controle Sham (n=4), Controle Infartado (n=4), Diabéticos Goto-Kakizaki Sham (n=7), Diabéticos Goto-Kakizaki Infartados (n=8), e ainda animais que desenvolveram DM através de dieta Hiperlipídica Sham (n=6) e animais com DM através de dieta Hiperlipídica Infartados (n=5).

Nesse ponto, vale ressaltar que os animais Goto-Kakizaki desenvolvem DM do tipo 2 espontaneamente, sem que haja a indução ou acometimento de obesidade associada. Desse modo, tem-se ao longo deste trabalho animais diabéticos do tipo 1, induzida por STZ; animais espontaneamente diabéticos do tipo 2, os Goto-Kakizaki; e os animais diabéticos tipo 2 induzida através de dieta hiperlipídica, de modo que uma comparação mais profunda pôde ser feita. Ainda, é valioso explanar que o infarto do miocárdio (IM) foi gerado a partir da oclusão da coronária.

A figura 46 ilustra a expressão do miRNA-34c-3p, quando não houve efeito isolado do DM tipo 2, espontâneo ou induzido por dieta hiperlipídica. Por outro lado, nos dois grupos diabéticos analisados, houve aumento na expressão do miRNA-34c-3p quando os animais foram infartados (92 e 74%, respectivamente), em parcial concordância com o que fora hipotetizado.

Figura 46: Expressão gênica do gene eIF4E em VE dos animais controles sham e infartados, diabéticos sham e infartados, e animais que sofreram com dieta hiperlipídica sham e infartados, através da técnica de RT-PCR. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p<0,05$ vs. Controle Sham; ** $p<0,001$ vs. Controle Sham; # $p<0,02$ vs. Controle Infartado; ### $p<0,0007$ vs. Controle Infartado; &&P $<0,007$ vs. Diabético Sham; &&&&p $<0,0001$ vs. Diabético Sham; \$ $p<0,01$ vs. Hiperlipídico Sham.

Quando analisadas as expressões dos genes alvo do miRNA-34c-3p validados nesse trabalho, apenas tendência na redução do eIF4E foi encontrada, como esquematiza a figura 47. Apesar da não significância, é importante ressaltar que a tendência à redução houve nos três grupos infartados analisados, mais uma vez excluindo-se o efeito isolado do DM.

Figura 47: Expressão gênica do gene eIF4E em VE dos animais controles sham e infartados, diabéticos sham e infartados, e animais que sofreram com dieta hiperlipídica sham e infartados, através da técnica de RT-PCR. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão.

Em convergência parcial com os achados no estudo 1, a expressão do KLF11 apareceu com tendência ao aumento nos 4 grupos diabéticos, sem que houvesse efeito combinado com o IM (Figura 48).

Figura 48: Expressão gênica do gene KLF11 em VE dos animais controles sham e infartados, diabéticos sham e infartados, e animais que receberam dieta hiperlipídica sham e infartados, através da técnica de RT-PCR. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão.

6.2 Animais Infartados e submetidos a Treinamento Físico Aeróbio

Com os dados obtidos na primeira parte do estudo 2, procedeu-se a análise isolada do IM e dos prováveis do TFA modulando o coração desses animais. No estudo de doutoramento do Doutor Stéphan Melo, os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos: Sedentários Sham (SS; n=5), Treinados Sham (ST; n=6),

Sedentários Infartados (IS; n=5) e Treinados Infartados (IT; n=6). Os animais foram então sedados e entubados para ventilação mecânica, e a toracotomia esquerda foi realizada. No grupo infartado, a artéria coronária anterior descendente esquerda foi ligada distalmente, e finalizado com o fechamento do tórax. Já o grupo sham, foi submetido ao estresse cirúrgico, mas sem que houvesse o procedimento de IM.

Após 30 dias da cirurgia torácica, os animais ST e IT foram submetidos a TFA de natação como descrito no item 4.2.4, em sistema de natação com água aquecida 30-32°C, com duração de 10 semanas com 5 sessões semanais de 60 minutos cada, com aumento gradual de sobrecarga até atingir 4% do peso corporal.

Com a análise dos dados do RT-PCR, como mostrado na figura 49, foi observado um aumento na expressão do miRNA-34c-3p nos animais infartados em relação ao controle (SS), mostrando que, possivelmente, o aumento deste miRNA está envolvido com o dano causado pelo IM. Houve uma diminuição de 39% na expressão desse miRNA quando avaliados os animais ST em relação ao seu controle, evidenciando que a inibição do miRNA-34c-3p está envolvido com o remodelamento cardíaco, no sentido da hipertrofia fisiológica encontrada pós TFA.

Figura 49: Expressão gênica do miRNA-34c-3p em VE dos animais sham sedentário e treinado, e infartados sedentário e treinado, através da técnica de RT – PCR. *p<0,02 vs. Sham Sedentário; #p<0,01 vs. Sham Sedentário.

Ao analisar a expressão do eIF4E, gene alvo do miRNA-34c-3p validado nesse trabalho, pode-se observar redução na expressão desse gene no grupo infartado sedentário (42%) e infartado treinado (36%), quando comparados com o grupo sham sedentário. Esses dados corroboram com a expressão exageradamente aumentada do miRNA-34c-3p no grupo infartado sedentário, e com redução desse miRNA como efeito do TFA, mas sem que houvesse a correção aos níveis basais do

miRNA-34c-3p, como demonstrado na figura 50A. Tem-se, ainda, que o TFA foi capaz de aumentar a expressão do eIF4E no grupo infartado treinado em 11%.

Quando analisada a expressão do eIF4BP1 (figura 50B), gene relacionado com a ativação do eIF4E, observa-se a mesma tendência de expressão do eIF4E: redução de sua expressão quando comparado com o grupo sham sedentário (44% no grupo infartado sedentário, e 38% no grupo infartado treinado).

Figura 50: Expressão gênica dos genes EIF4E e eIF4BP1 em VE dos animais sham sedentário e treinado, e infartados sedentário e treinado, através da técnica de RT-PCR. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,03$; ** $p < 0,002$; *** $p < 0,001$ vs. Sham sedentário.

Apesar da modulação observada nos genes relacionados à contratilidade e HC, o mesmo não foi confirmado quando analisados o KLF11 e o Glut-4, genes envolvidos no metabolismo celular, como observa-se na figura 51.

Apesar de ter havido uma brusca redução na expressão do Glut-4 quando comparados o grupo sham e o infartado, o TFA não foi eficiente em promover melhoras na expressão desse gene, como se era esperado.

Figura 51: Expressão gênica dos KLF11 e Glut-4, em VE dos animais sham sedentário e treinado, e infartados sedentário e treinado, através da técnica de RT-PCR. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão.

7 Conclusões e Perspectivas

Com os dados demonstrados nesse estudo, tem-se que o TFA foi eficaz em promover melhoras no metabolismo oxidativo do ventrículo esquerdo de animais diabéticos treinados, demonstrado pela melhora na atividade da enzima citrato sintase, bem como no teste de esforço físico máximo. Ainda, o TFA mostrou-se eficaz na melhora de parâmetros bioquímicos, inclusive frente à diminuição de marcadores de doença renal crônica, uma das principais deflagrações da DM. Ainda, o TFA exerceu um papel importante nos marcadores de HC patológica, mostrando que o exercício físico foi responsável por atenuar estes marcadores, revertendo a diminuição da razão α -MCP e β -MCP nos animais diabéticos treinados. Nesse mesmo sentido, o TFA foi capaz de exercer importante papel nos parâmetros hemodinâmicos, promovendo bradicardia de repouso nos grupos euglicêmico e diabético treinados, com redução nas pressões arteriais sistólicas e diastólicas. Evidencia-se ainda a hipertrofia cardíaca atestada pelo aumento no diâmetro do cardiomiócitos dos grupos treinados.

De forma sistêmica, o TFA também teve fundamental papel na possível melhora na captação de nutrientes dos animais diabéticos, uma vez que, mesmo perdendo tecido adiposo, o que aparentemente seria algo prejudicial, uma vez que esses animais apresentam caquexia da musculatura esquelética, bem como do tecido adiposo, os animais diabéticos treinados consomem mais ração, excretam menos, e ganham peso corporal, quando avaliados por gaiola metabólica e comparados com os animais diabéticos sedentários.

Encontramos ainda que o TFA promove diminuição da expressão do miRNA-34c-3p no VE dos animais treinados, tal qual resposta encontrada no estudo de larga escala realizado anteriormente em nosso laboratório. Essa resposta também foi semelhante àquela encontrada em cardiomiócitos transfectados com inibidor do miRNA-34c-3p (amiR-34c-3p).

Ao analisarmos o segundo gene alvo do miRNA-34c-3p previamente validado pelo estudo inicial que culminou no projeto ora desenvolvido, o KLF11, encontramos que este responde como esperado ao estímulo do TFA, em consonância com os dados de cultura celular de cardiomiócitos. Ao ter a sua expressão diminuída, o miRNA-34c-3p foi capaz de aumentar a expressão do gene do KLF11 nos animais treinados. Acompanhando esse resultado, houve aumento na expressão do Glut-4 no

VE de animais diabéticos treinados ao compararmos com os animais diabéticos sedentários. É importante questionarmos nesse momento, qual a relação do aumento da expressão gênica do KLF11 frente à DM com diminuição do Glut-4 nesses animais, acompanhados do aumento da expressão do IRS2, e como o TFA foi capaz de, ainda que de maneira sutil, alterar esses padrões sempre no mesmo sentido que as respostas dos animais euglicêmicos.

No sentido de aprofundarmos o estudo do miRNA-34c-3p e do gene KLF11, ao promovermos o silenciamento gênico deste gene através de siRNA, encontramos novamente a confirmação do pareamento entre o KLF11 e o miRNA-34c-3p, quando houve aumento do miRNA frente ao silenciamento gênico do KLF11.

Como consequência da diminuição da expressão do miRNA-34c-3p e após validação do eIF4E como segundo gene alvo do miRNA-34c-3p e, em cultura de cardiomiócitos a sua expressão estava aumentada quando da inibição do miRNA-34c-3p, esperávamos um aumento de sua expressão no VE dos animais treinados, o que não se concretizou. Apesar de não termos encontrado diferença estatística, houve uma tendência no aumento da expressão de gene, acompanhada de aumento na expressão gênica da mTOR. O estudo mais profundo e minucioso sobre esse gene e sua real função, deve ser continuado de forma isolada na cultura celular, uma vez que nossa hipótese é exatamente a de que a interação miRNA-34c-3p com o gene do eIF4E seja responsável por uma resposta breve, porém de suma importância, na HC fisiológica e melhora da função cardíaca. Com isso, estudos com inibição da via da PI3K-AKT-mTOR pelo fármaco Wortaminn deve ser proposto *a posteriori*.

Assim como realizados no estudo do KLF11, ao promovermos o silenciamento gênico deste gene através de siRNA, encontramos mais uma vez a ligação entre essas moléculas. Ao inibirmos o eIF4E, houve aumento da expressão do miRNA-34c-3p, tal qual quando inibimos o miRNA-34c-3p houve aumento da expressão gênica do eIF4E. De maneira bastante interessante, houve o aumento da expressão do eIF4E ao tratar células com *knock-down* para este gene com o inibidor do miRNA-34c-3p, reiterando a hipótese do uso terapêutico da inibição desse microRNA.

Nesse mesmo sentido, ao caminharmos no estudo da expressão do miRNA-34c-3p em outras cardiopatias, encontramos que há um aumento consistente na expressão desse miRNA em animais infartados, sem que haja manutenção desse efeito nos diferentes tipos de diabetes. Em resposta a hipótese do uso terapêutico do treinamento físico aeróbico, encontramos que este é capaz de promover a inibição do

miRNA-34c-3p e aumento do eIF4E em animais cardiopatas, que, atuando em seus alvos agora validados, foi capaz de promover HC fisiológica e melhora metabólica em cardiomiócitos. Considerando os efeitos cardioprotetores da inibição desse miRNA, e mais, da capacidade de reverter efeitos deletérios frente à inibição do eIF4E, vislumbra-se com esse trabalho o caminho até o profundo entendimento do potencial terapêutico dessa inibição em pacientes infartados na perspectiva de atenuação de prejuízos causados por cardiopatias.

Referências

1. WHO. Diabetes. Fact Sheet number 312. Vol. 2015. 2015.
2. Richter EA, Hargreaves M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol Rev*. 2013;93(3):993–1017.
3. De Angelis K, Irigoyen MC, Morris M. Diabetes and cardiovascular autonomic dysfunction: application of animal models. *Aut Neurosci*. 2009;145(1–2):3–10.
4. Fernandes T, Magalhães FC, Roque FR, Phillips MI, Oliveira EM. Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: Role of microRNAs-16, -21, and -126. *Hypertension*. 2012;59(2 SUPPL. 1):513–20.
5. Cook T, Gebelein B, Mesa K, Mladek A, Urrutia R. Molecular cloning and characterization of TIEG2 reveals a new subfamily of transforming growth factor-beta-inducible Sp1-like zinc finger-encoding genes involved in the regulation of cell growth. *J Biol Chem*. 1998;273(40):25929–36.
6. Zheng Y, Kong Y, Li F. Krüppel-like transcription factor 11 (KLF11) overexpression inhibits cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Jan 10;443(2):683–8.
7. Neve B, Fernandez-Zapico ME, Ashkenazi-Katalan V, Dina C, Hamid YH, Joly E, et al. Role of transcription factor KLF11 and its diabetes-associated gene variants in pancreatic beta cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(13):4807–12.
8. ADA. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37(S1):10.
9. IDF. IDF Diabetes Atlas [Internet]. Sixth edit. Federation ID, editor. 2013. Available from: http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf
10. SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo: AC Farmacêutica; 2015.
11. Sartorelli DS, Franco LJ. [Trends in diabetes mellitus in Brazil: the role of the nutritional transition]. *Cad Saude Publica*. 2003;19 Suppl 1:S29-36.
12. Yagihashi S. Pathology and pathogenic mechanisms of diabetic neuropathy. *Diabetes Metab Rev*. 1995;11(3):33.
13. Muir A, Schatz DA, Maclaren NK. The pathogenesis, prediction, and prevention of insulin-dependent diabetes mellitus. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1992;21(2):199–219.
14. Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, O'Grady MJ, Lee ET, Welty TK, et al. Impact of diabetes on cardiac structure and function: the strong heart study. *Circulation*. 2000;101(19):2271–6.
15. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(8):589–600.
16. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991;83(6):1849–65.
17. Scheuermann-Freestone M, Madsen PL, Manners D, Blamire AM, Buckingham RE, Styles P, et al. Abnormal cardiac and skeletal muscle energy metabolism in patients with type 2 diabetes. *Circulation*. 2003;107(24):3040–6.
18. Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, Essien UN. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. Vol. 12, *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*. 2013.

19. Bolzán AD. Genotoxic effects of streptozotocin. *Streptozotocin: Uses, Mechanism of Action and Side Effects*. 2014.
20. D.C. D, A.O. N, I.L. I, F.Q. G, S.B. C, B. D, et al. Streptozotocin-induced diabetes models: Pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014;2014:819065. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/biomed/%0Ahttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed16&NEWS=N&AN=373280133>
21. Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1967;126(1):201–5.
22. Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*. 2001;344(18):1343–50.
23. Pedersen BKK, Saltin B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand J Med Sci Sport*. 2006;16 Suppl 1(0905–7188 (Linking)):3–63.
24. Marwick TH, Hordern MD, Miller T, Chyun DA, Bertoni AG, Blumenthal RS, et al. Exercise training for type 2 diabetes mellitus: impact on cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2009;119(25):3244–62.
25. Mostarda C, Rogow A, Moraes Silva IC, De La Fuente RN, Jorge L, Rodrigues B, et al. Benefits of exercise training in diabetic rats persist after three weeks of detraining. *Auton Neurosci Basic Clin*. 2009;145(1–2):11–6.
26. Hall KE, McDonald MW, Grise KN, Campos OA, Noble EG, Melling CW. The role of resistance and aerobic exercise training on insulin sensitivity measures in STZ-induced Type 1 diabetic rodents. *Metabolism*. 2013;62(10):1485–94.
27. Goodyear LJ, Kahn BB. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med*. 1998;49:235–61.
28. Ivy JL. Role of exercise training in the prevention and treatment of insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Sport Med*. 1997;24(5):321–36.
29. Lund S, Holman GD, Schmitz O, Pedersen O. Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(13):5817–21.
30. Ling S, Birnbaum Y, Nanhwan MK, Thomas B, Bajaj M, Li Y, et al. Dickkopf-1 (DKK1) phosphatase and tensin homolog on chromosome 10 (PTEN) crosstalk via microRNA interference in the diabetic heart. *Basic Res Cardiol*. 2013;108(3):352.
31. Yap TA, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS, Workman P. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. Vol. 8, *Current Opinion in Pharmacology*. 2008. p. 393–412.
32. McMullen JR, Shioi T, Zhang L, Tarnavski O, Sherwood MC, Kang PM, et al. Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12355–60.
33. HASHIMOTO NY, FERNANDES T., SOCI UPR., OLIVEIRA EM. Determinantes Moleculares Da Hipertrofia Cardíaca Induzida Por Diferentes Volumes De Treinamento Aeróbio. *Rev Bras Cardiol*. 2011;24(3):10.
34. Soci UPR, Fernandes T, Hashimoto NY, Mota GF, Amadeu MA, Rosa KT, et al. MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance

- promoted by aerobic exercise training in rats. *Physiol Genomics*. 2011;43(11):665–73.
35. Magalhães FC, Barretti B, Hashimoto N, Melo SFS, Roque FR, Oliveira EM. Hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento físico: eventos moleculares e celulares que modificam o fenótipo. *Rev Mackenzie Educ Física e Esporte*. 2008;7(1):5.
 36. Fernandes T, Paula U, Soci R. Determinantes Do Músculo Esquelético Mediados Pelo Treinamento Físico: Estudo De Vias De Sinalização. 2008;7(1):169–88.
 37. OLIVEIRA EM, ALVES GB, BRUM PC, KRIEGER JE. Aspectos Moleculares da Hipertrofia dos Músculos Cardíaco e Esquelético após o Treinamento Físico. In: Negrão CE, Barreto ACP, editors. *Cardiologia do Exercício*. Barueri - São Paulo: Editora Manole; 2006. p. 55–79.
 38. Mill JG, Vassallo DV. Hipertrofia cardíaca. *Rev Bras Hipertens*. 2001;8(1):63–75.
 39. Shioi T, Kang PM, Douglas PS, Hampe J, Yballe CM, Lawitts J, et al. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J*. 2000;19(11):2537–48.
 40. Taniguchi CM, Ueki K, Kahn CR. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *J Clin Invest*. 2005;115(3):718–27.
 41. McMullen JR, Shioi T, Huang W-Y, Zhang L, Tarnavski O, Bisping E, et al. The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. *J Biol Chem*. 2004;279(6):4782–93.
 42. Cantley LC. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science* (80-). 2002;296(5573):1655–7.
 43. Proud CG. Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. Vol. 63, *Cardiovascular Research*. 2004. p. 403–13.
 44. Carrera AC. TOR signaling in mammals. *J Cell Sci*. 2004/09/17. 2004;117(Pt 20):4615–6.
 45. Vary TC, Deiter G, Lynch CJ. Rapamycin limits formation of active eukaryotic initiation factor 4F complex following meal feeding in rat hearts. *J Nutr*. 2007;137(8):1857–62.
 46. Richter JD, Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*. 2005;433(7025):477–80.
 47. UNIPROT. Eukaryotic translation initiation factor 4E [Internet]. Vol. 2012. 2012. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P06730>
 48. Fazakerley DJ, Lawrence SP, Lizunov VA, Cushman SW, Holman GD. A common trafficking route for GLUT4 in cardiomyocytes in response to insulin, contraction and energy-status signalling. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 5):727–34.
 49. Holloszy JO. Regulation of mitochondrial biogenesis and GLUT4 expression by exercise. *Compr Physiol*. 2011;1(2):921–40.
 50. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*. 2007;74(2):184–95.
 51. Ellenrieder V, Buck A, Harth A, Jungert K, Buchholz M, Adler G, et al. KLF11 mediates a critical mechanism in TGF-beta signaling that is inactivated by Erk-MAPK in pancreatic cancer cells. *Gastroenterology*. 2004;127(2):607–20.
 52. Cullingford TE, Butler MJ, Marshall AK, Tham EL, Sugden PH, Clerk A. Differential regulation of Krüppel-like factor family transcription factor expression in neonatal rat cardiac myocytes: effects of endothelin-1, oxidative stress and

- cytokines. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783:1229–36.
53. Song CZ, Gavrilidis G, Asano H, Stamatoyannopoulos G. Functional study of transcription factor KLF11 by targeted gene inactivation. *Blood Cells Mol Dis*. 2005;34(1):53–9.
 54. Fan Y, Guo Y, Zhang J, Subramaniam M, Song CZ, Urrutia R, et al. Kruppel-like factor-11, a transcription factor involved in diabetes mellitus, suppresses endothelial cell activation via the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2012/10/09. 2012;32(12):2981–8.
 55. Fernandez-Zapico ME, Mladek A, Ellenrieder V, Folch-Puy E, Miller L, Urrutia R. An mSin3A interaction domain links the transcriptional activity of KLF11 with its role in growth regulation. *EMBO J*. 2003;22(18):4748–58.
 56. Yap TA, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS, Workman P. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Curr Opin Pharmacol*. 2008;8(4):393–412.
 57. Bonnefond A, Lomberk G, Buttar N, Busiah K, Vaillant E, Lobbens S, et al. Disruption of a novel Kruppel-like transcription factor p300-regulated pathway for insulin biosynthesis revealed by studies of the c.-331 INS mutation found in neonatal diabetes mellitus. *J Biol Chem*. 2011;286(32):28414–24.
 58. Youngren JF. Exercise and the regulation of blood glucose. Vol. 2015. 2009.
 59. Kondo T, Kahn CR. Altered insulin signaling in retinal tissue in diabetic states. *J Biol Chem*. 2004;279(36):37997–8006.
 60. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):376–85.
 61. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010;466(7308):835–40.
 62. Hartmann D, Thum T. MicroRNAs and vascular (dys)function. Vol. 55, *Vascular Pharmacology*. 2011. p. 92–105.
 63. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004;5(7):522–31.
 64. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. In: *PLoS Biology*. 2005. p. 0404–18.
 65. Hammond SM. Dicing and slicing: The core machinery of the RNA interference pathway. Vol. 579, *FEBS Letters*. 2005. p. 5822–9.
 66. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843–54.
 67. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75:855–62.
 68. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):858–62.
 69. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* [Internet]. 2004;431(7006):350–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature02871>
 70. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli a E, Bettinger JC, Rougvie a E, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901–6.
 71. Lee RC, Ambros V, Erdmann VA, Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, et al. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*.

- 2001;294(5543):862–4.
72. Ruvkun G, Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808):86–9.
73. Pasquinelli AE, Hunter S, Bracht J. MicroRNAs: A developing story. Vol. 15, *Current Opinion in Genetics and Development*. 2005. p. 200–5.
74. Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(D1).
75. Liu N, Williams AH, Maxeiner JM, Bezprozvannaya S, Shelton JM, Richardson JA, et al. MicroRNA-206 promotes skeletal muscle regeneration and delays progression of Duchenne muscular dystrophy in mice. *J Clin Invest*. 2012;122(6):2054–65.
76. Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs. Vol. 222, *Journal of Cellular Physiology*. 2010. p. 540–5.
77. Czech B, Hannon GJ. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet*. 2011;12(1):19–31.
78. Kingwell K. Cardiovascular disease: microRNA protects the heart. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10:98.
79. Thum T. MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine. Vol. 4, *EMBO Molecular Medicine*. 2012. p. 3–14.
80. Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*. 2005;123(4):621–9.
81. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003;115(2):199–208.
82. Khvorovova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003;115(2):209–16.
83. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Vol. 136, *Cell*. 2009. p. 642–55.
84. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15–20.
85. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*. 2003;115(7):787–98.
86. Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*. 2002;110(4):513–20.
87. MIRDB. Mature sequence rno-miR-34c-3p. Vol. 2014. 2014.
88. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther*. 2010 Oct;128(1):191–227.
89. Sanches IC, Conti FF, Bernardes N, Brito Jde O, Galdini EG, Cavaglieri CR, et al. Impact of combined exercise training on cardiovascular autonomic control and mortality in diabetic ovariectomized rats. *J Appl Physiol*. 2015;119(6):656–62.
90. Medeiros A, Oliveira EM, Gianolla R, Casarini DE, Negrao CE, Brum PC. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(12):1909–17.
91. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54.
92. Alp PR, Newsholme E a, Zammit V a. Activities of citrate synthase and NAD+-

- linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J.* 1976;154(3):689–700.
93. Toth MJ, Ward K, van der Velden J, Miller MS, Vanburen P, Lewinter MM, et al. Chronic heart failure reduces Akt phosphorylation in human skeletal muscle: relationship to muscle size and function. *J Appl Physiol.* 2011;110(4):892–900.
 94. Ganda OP, Rossini AA, Like AA. Studies on Streptozotocin Diabetes. *Diabetes.* 1976;25(7):595–603.
 95. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest.* 1969;48(11):2129–39.

Apêndice A: Estudo Piloto do modelo de Diabetes por Estreptozotocina

A. 1 Caracterização do Modelo Experimental

Entendendo que a literatura não possui um consenso quanto à dose de STZ a ser aplicada em ratos, além do constante relato de morte ao longo de protocolos mais extensos como o proposto nesse estudo (10 semanas de TFA), fez-se necessário um pré-estudo investigativo para que os procedimentos de aplicação e dose da STZ pudessem ser padronizados.

Para tanto, dividimos 18 ratos Wistar em 6 grupos experimentais com 3 animais cada:

- a. 0mg/kg: animais controle que receberam apenas o tampão citrato com 9 semanas de nascimento;
- b. 30mg/kg: animais que receberam uma dose de 30mg/kg de STZ com 9 semanas de nascimento;
- c. 40mg/kg: animais que receberam uma dose de 40mg/kg de STZ com 9 semanas de nascimento;
- d. 50mg/kg: animais que receberam uma dose de 50mg/kg de STZ com 9 semanas de nascimento;
- e. 40mg/kg: animais que receberam duas doses de 40mg/kg de STZ com 6 semanas de nascimento;
- f. 45mg/kg: animais que receberam uma dose de 45mg/kg de STZ com 6 semanas de nascimento.

A primeira indagação a ser respondida foi sobre a dose de STZ a ser aplicada nos animais, na tentativa de observarmos uma DM compensada, com glicemia casual superior a 200mg/dL, mas não superior a 350mg/dL. Os animais então ficaram em jejum prévio de 6 horas, e receberam a injeção intraperitoneal de 0, 30, 40 ou 50 mg/kg, com tampão citrato (0,01M, pH=4,5). Segundo o fabricante da STZ, a Sigma-Aldrich, 24 horas após a injeção do fármaco, todos os sintomas da DM tipo I estariam presentes nos animais. Considerando isto, fizemos a medição da glicemia 24 e 72 horas após a aplicação, e não observamos resultados interessantes nos grupos 30 e 40 mg/kg no que diz respeito a glicemia mínima para atestarmos a DM. Como

demonstrado na figura 52, no grupo 30mg/dL, não houve resposta em todos os animais. Já no grupo 40mg/kg, dos 3 animais, apenas 1 respondeu ao estímulo do fármaco. No grupo que recebeu 50mg/kg, observamos o aumento abrupto da glicemia 24 horas após a aplicação. Entretanto, dos 3 animais desse grupo, 2 responderam satisfatoriamente, enquanto que 1, a partir da terceira semana pós-aplicação, apresentou regressão da glicemia, em mecanismo de compensação da captação de glicose frente a supressão de insulina, ou ainda de regeneração das células beta-pancreáticas.

Com esses resultados, nos perguntamos se essa resposta tanto da ineficácia do tratamento quanto da regressão, seriam devido à idade dos animais. Dessa forma, nos indagamos quanto à dose intermediária não testada (45mg/kg), bem como com a maturação do animal (aplicação com 6 semanas após o nascimento). Além disso, nos perguntamos sobre a possibilidade de melhor eficiência de resposta com combinação de doses. Assim, resolvemos testar a aplicação do fármaco na sexta semana de vida dos animais, quando os animais ainda não atingiram a maturação biológica e possuíam peso corporal menor (figura 52) e testarmos a dupla aplicação de 40mg/kg, com 24 horas de espaçamento entre as aplicações, uma vez que a meia-vida do fármaco é de minutos, mas o pico de seu efeito se estende até as primeiras 24 horas, e a aplicação única de 45mg/kg, mantendo as 6 horas de jejum prévio.

Figura 52: Piloto 1. Peso Corporal e Glicemia dos animais do momento de aplicação da STZ até o final do protocolo, com 16 semanas, ou seja, 6 semanas a mais que o protocolo de TFA de natação proposto nesse projeto. Dados apresentamos em mg/dL.

Como visto na figura 52B, tivemos que o efeito da dupla aplicação da dose de 40mg/kg não se mostrou eficiente, tendo seu efeito apenas em 1 dos 3 animais do grupo, com aumento de glicemia apenas 7 dias após a aplicação da primeira dose. Por outro lado, apesar de um aumento discreto da glicemia nas primeiras 72 horas, a dose de 45mg/kg mostrou-se mais eficiente, apesar de ter havido 1 animal não responsivo. Com isso, estabelecemos que os animais deverão receber a dose de STZ na sexta semana de vida, e não somente após a oitava semana, como proposto anteriormente, e que a dose a ser usada será a de 45 mg/kg, uma vez que apesar de ter sido observado um animal não responsivo ao tratamento, não houve regressão ao longo do período observado.

Com o intuito de entender a não responsividade de alguns animais frente a dose de 45mg/kg, e após revisar os primeiros estudos de caracterização do modelo de diabetes insulino-dependente por STZ (94,95), levantamos a hipótese de que o jejum prolongado, e consequente diminuição da ação das células β -pancreáticas, visto que haverá uma diminuição da glicose a ser captada pelo Glut-2 no pâncreas, permitindo maior ligação da STZ neste transportador, pode levar a um aumento da responsividade desses animais. Para melhor entender esses mecanismos, propusemos os seguintes grupos experimentais no piloto 2, animais com mesmo peso corporal como nota-se na figura 53, que passaram por jejum de 32 horas antes da indução da DM:

- a. 0mg/kg: animais que receberam tampão citrato, 6 semanas após o nascimento, com 4 animais;

- b. 45mg/kg: animais que receberam uma dose de 45mg/kg, 6 semanas após o nascimento, com 11 animais;

Frente a resposta encontrada nos animais do grupo 45mg/kg após 24 horas da aplicação da primeira dose, como demonstrado na figura 53, os animais foram mais uma vez divididos. Aqueles animais que já apresentaram glicemia maior do que 300mg/dL permaneceram sem outro tratamento. Aqueles animais que apresentaram leve aumento de glicemia, foram divididos em 2 grupos para receberem doses-reforço, na tentativa de descobrir se os animais são de fato resistentes ou se precisariam de uma dose de STZ mais acentuada. Os grupos foram:

1. 45+15mg/kg: receberam um reforço de 15mg/kg;
2. 45+45mg/kg: receberam um reforço de 45mg/kg.

Figura 53: Piloto 2. Peso corporal dos animais da semana de aplicação da STZ até o final do protocolo, com 11 semanas, ou seja, 1 semana a mais que o protocolo de TFA de natação proposto nesse projeto. Dados apresentados em gramas.

Como observado na figura 54, dos 4 animais do grupo 45+15mg/kg, 2 responderam ao reforço do fármaco, porém outra metade não. Já no grupo 45+45mg/kg, os 2 animais, que após a primeira aplicação apresentaram aumento glicêmico bastante discreto, apresentaram aumento abrupto da glicemia.

Figura 54: Piloto 2. Peso corporal dos animais da semana de aplicação da STZ até o final do protocolo, com 11 semanas, ou seja, 1 semana a mais que o protocolo de TFA de natação proposto nesse projeto. Dados apresentados em gramas.

Considerando a necessidade de melhor mapeamento dos aspectos fisiológicos desses animais, submetemos 4 animais diabéticos (grupo 45mg/kg) e 4 animais euglicêmicos a 24 horas em gaiola metabólica, conforme ilustra figura 55. Com isto, encontramos que os animais diabéticos consomem um volume maior de água, porém com volume urinário bastante exacerbado, como visto na figura 55. Um dado bastante importante foi o maior consumo de ração pelos animais diabéticos, dado confirmado pelo controle de ração feito semanalmente, apesar desses animais terem um peso corporal menor do que aqueles euglicêmicos.

É importante ressaltar que no piloto 1, 1 animal do grupo 50mg/kg desenvolveu catarata 13 semanas após a aplicação da STZ. Já no piloto 2, 2 animais desenvolverem catarata na décima semana após a aplicação do fármaco. Apesar da glicemia exacerbadamente alta, vale ressaltar que não houve morte de animais no piloto 1 ou piloto 2. Ambos os períodos excedem o tempo de protocolo de treinamento físico aeróbio proposto neste projeto.

Figura 55: Piloto 2. Dados obtidos em gaiola metabólica. Dados apresentados em gramas e mililitros.

É relevante levantar que, considerando o volume urinário observado nos animais diabéticos nas 24 horas que permaneceram na gaiola metabólica, evidenciou-se a necessidade de cuidados especiais com estes animais. Assim, a partir da análise e acompanhamento diário da progressão da doença, e ressaltando a necessidade de melhor condição de vida dos animais, as caixas em que os animais diabéticos foram acondicionados foram trocadas diariamente, com reposição de água e ração também diários. Considerando a acentuada perda de peso corporal desses animais, e a consequente fragilidade física, apenas a aluna responsável pelo estudo foi responsável pelo manejo diário desses animais.

Com isso, estabelecemos a rotina de aplicação da STZ, e o padrão de resposta a partir da dose escolhida, além de práticas de manejo animal necessárias a melhor qualidade de vida dos animais. Dessa forma, no grupo experimental, utilizaremos a dose de STZ de 45mg/kg, dose esta que será aplicada em animais que passarão por jejum prévio de 32 horas. Os animais que não apresentarem resposta de aumento glicêmico 24 horas após a indução receberão dose reforço de 45mg/kg, e configurarão um novo grupo experimental. As caixas dos animais serão trocadas, e a água e a ração serão repostas diariamente. Ainda, estabelecemos que os animais somente iniciarão o protocolo de TFA 14 dias após indução à DM, uma vez que há um retardamento na resposta fidedigna e permanente da STZ.

Relatório de Atividades

- Participação em Reuniões Científicas

Reunião semanal de discussão de trabalhos científicos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício, com alunos de pós-graduação e pós-doutoramento vinculados ao laboratório, bem como com pesquisadores convidados e coordenadora do grupo.

- Cursos, Aulas e Palestras Ministrados

Ministrei, junto com o Doutor Paulo Roberto Jannig, o minicurso “Fisiologia do exercício e biologia molecular: uma nova abordagem para velhas questões” no VII Congresso de Iniciação Científica USP / Unicamp / Unesp, com carga horária 3 horas/aula. Além disso, ministrei, juntamente com a Profa. Dra. Telma Cunha, a aula de final de Revisão Geral do Curso de Fisiologia e Bioquímica do Exercício no Curso de Verão da EEFEUSP, com carga horária 3 horas/aula.

Durante a disciplina EFB0100 - Genética da Atividade Motora, ministrei a aula “Utilizando o DNA na pesquisa: introdução ao PCR”, com carga horária 2 horas/aula, em agosto de 2017. Ainda, ministrei as aulas “Metabolismo de Proteína” e “Lactato e Teoria do Treinamento Físico”, na disciplina EFB0203 - Bioquímica da Atividade Motora, com carga horária de 6 horas/aula cada, em agosto de 2017.

Participei como conferencista da mesa redonda em comemoração aos 25 anos do Simpósio Internacional de iniciação Científica e Tecnológica da USP, no dia 25 de outubro de 2017, no Centro de Difusão internacional da USP.

A convite da Comissão de Pós-Graduação da EEFEUSP, concedi a palestra “Representação Discente na Pós-Graduação” durante o Seminário inaugural da Pós-Graduação EEFEUSP, no dia 16 de março de 2018.

- Programa de Aperfeiçoamento de Ensino na Pós-Graduação

Como resultado da aprovação na disciplina de Docência no Ensino Superior, pude ser estagiária na disciplina EFB0106-3 - Fisiologia da Atividade Motora II do Núcleo Geral dos cursos de Licenciatura em Educação Física e Bacharelados em Educação Física e Esporte, vinculada ao Departamento de Biodinâmica – EEFEUSP, com carga horária igual a 130 horas/aula, podendo ser requerido a inclusão de 4 créditos em histórico escolar por tal participação.

Participar desse programa foi de extrema valia para a minha formação, principalmente pelo acompanhamento do professor tutor. Ser ensinada a enxergar a sala de aula por ângulos diferentes, bem como perceber a diversidade de prismas com que os alunos adquirem o mesmo conhecimento foi fabuloso, transformador.

- Produção Acadêmica

Participei, como primeira autora, da produção do capítulo de livro “MicroRNAs e Marcadores Moleculares ao Exercício” no livro “Bases Moleculares da Hipertrofia e do Condicionamento Físico”, que tem como editores Prof. Dr. Bernardo Petriz e Prof. Dr. Jeaser Alves de Almeida.

Ainda, participei como autora colaboradora na produção do capítulo de livro “Exercise Training and Epigenetic Regulation: Multilevel Modification and Regulation of Gene Expression” no livro “Exercise benefits the Heart: Basic Science and Clinical Evidence”, que tem como primeira autora Ursula Paula Reno Soci, e editor o Prof. Junjie Xiao, e foi publicado pela *Springer Nature*.

Além disso, como resultado de colaboração com o Laboratório de Biomecânica da EEFEUSP, participei como autora colaboradora do trabalho “Adherence to six months of instructed minimalist and barefoot running training”, de autoria da Profa. Dra. Ana Paula da Silva Azevedo, e foi publicado na Rev Bras Med Esporte – Vol. 22, No 3 – Mai/Jun, 2016.

Participei como colaboradora do trabalho “Physical Exercise and Regulation of Intracellular Calcium in Cardiomyocytes of Hypertensive Rats”, de autoria principal de Joel Alves Rodrigues e Antonio Natali, publicado nos Arquivos Brasileiros de Cardiologia – Jul, 2018.

Ainda, contribui na atualização do capítulo "Aspectos moleculares da hipertrofia muscular provocada pelo exercício físico" do livro "Cardiologia do Exercício", que tem como coordenadores os Profs. Drs. Antônio Carlos Pereira Barretto, Carlos Eduardo Negrão e Maria Urbana Pinto Brandão Rondon.

- Prêmios Científicos

- Finalista na categoria de Melhor Pesquisa Básica do departamento de Educação Física da SOCESP no XXXIX Congresso da SOCESP, com o trabalho "Potencial Terapêutico da inibição do microRNA-34c-3p: Desvendando Reguladores Moleculares através do Treinamento Físico Aeróbio", de autoria de Clara Nóbrega e Edilamar Menezes de Oliveira;
- Terceiro Lugar na categoria de Melhor Pesquisa Básica do departamento de Educação Física da SOCESP no XXXIX Congresso da SOCESP, com o trabalho "Perfil de micrornas em ratas treinadas e seu potencial terapêutico em ratos espontaneamente hipertensos", de autoria de Ursula Reno Soci, Tiago Fernandes, Clara Nóbrega, Valério G. Barauna, Stephano Melo, Maria Claudia Irigoyen, Silvia Lacchini e Edilamar Menezes de Oliveira;
- Menção Honrosa na XXXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FesBE, com o trabalho "MicroRNA-34c-3p e Hipertrofia Cardíaca Fisiológica: Desvendando Reguladores Moleculares através do Treinamento Físico Aeróbico;
- *Travel Grant* e *Lab Visiting* na Rutgers University, NJ, EUA., por trabalho selecionado entre os 5 melhores apresentados do 23º SIICUSP, Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo;
- *Travel Grant* para participação da Jornada Nacional de Iniciação Científica, evento paralelo à 68ª Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Porto Seguro – BA.

- Participação em Eventos Científicos com apresentação de trabalho
 - *38th World Congress of the International Union of Physiological Sciences*, Rio de Janeiro, Brasil, nos dias 1 – 5 de Agosto de 2017, com o trabalho “MicroRNA profile in Swimming Trained Female Rats and Its Therapeutic Potential in Spontaneous Hypertensive Rats”, apresentado pela autora principal Ursula Reno Soci, e com contribuição de Clara Nóbrega, Tiago Fernandes, Valerio Garrone Baraúna e Edilamar Menezes de Oliveira;
 - *Cell Symposia: Exercise Metabolism*, Gotemburgo, Suécia, nos dias 21 – 23 de maio de 2017, com o trabalho “Effects of microRNA-34c-3p inhibition on Cardiomyocytes Hypertrophy”;
 - XXXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FesBE, Foz do Iguaçu, RS, nos dias 29, 30 e 31 de agosto, e 1 de setembro de 2016, com o trabalho “MicroRNA-34c-3p e Hipertrofia Cardíaca Fisiológica: Desvendando Reguladores Moleculares através do Treinamento Físico Aeróbico”;
 - Jornada Nacional de Iniciação Científica – atividade integrante da 68ª Reunião Anual da SBPC, Porto Seguro, BA, entre os dias 3 e 9 de julho, com o trabalho “Efeito da inibição do microRNA-34c-3p na hipertrofia de cardiomiócitos em cultura celular”;
 - George H. Cook Scholar: Presentation of The Honors Theses, Rutgers University, New Jersey, EUA, no dia 15 de abril, com apresentação oral do trabalho “Effects of microRNA-34c-3p inhibition on Cardiomyocytes Hypertrophy”;

- Participação em Eventos Científicos sem apresentação de trabalho
 - I SMART SYMPOSIUM “Skeletal Muscle Applied Research and Therapy”, realizado em São Paulo, no dia 27 de outubro de 2017;
 - Seminário de Ética em Pesquisa, realizado em São Paulo, no dia 22 de agosto de 2017;

- XXXII Reunião Anual da FESBE, realizada em Campos do Jordão, entre os dias 3 e 6 de setembro de 2017;
 - Simpósio Internacional Fronteiras de Conhecimento em microRNA e RNA, promovido pelo NAPmiR, no dia 11 de agosto de 2017;
 - Organização do Encontro Filosófico sobre Epigenética, Educação Física e Esporte, realizado no dia 14 de junho de 2017, na EEFEUSP;
 - Colaboradora do Pint of Science Brasil, realizado em São Paulo, entre os dias 15 e 17 de maio de 2017, com carga horária de 6 horas;
 - Organização do Seminário Inaugural da Pós-Graduação EEFEUSP, realizado no dia 24 de março de 2017;
 - I Simpósio de Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte da USP, realizado no dia 18 de novembro de 2016, na EEFEUSP;
 - IV Ciclo de Conferências em Educação Física e Esporte, EEFEUSP, atendendo às seguintes palestras, com carga horária igual a duas horas cada: 1) Uma experiência de quatro décadas em fisiologia e cardiologia do exercício num contexto translacional; 2) Cobertura jornalística dos jogos Olímpicos: informação ou entretenimento?; 3) Performance motora da Seleção Brasileira Feminina de Voleibol.
- Treinamentos e habilitações
 - Treinamento em Sistema de Edição Gênica CRISPR/Cas9: uma introdução à ferramenta e sua aplicação na edição de genomas, certificado pela ThermoFisher Scientific;
- Vínculos e Filiações
 - Representante discente da pós-graduação titular da Comissão de Pós-graduação da Escola de Educação Física e Esporte da USP – 2016/2017;
 - Representante discente da pós-graduação no Núcleo de Direitos Humanos da Escola de Educação Física e Esporte da USP – 2016/2018;

- Membro da Sociedade Brasileira de Fisiologia, SBFis, desde 2015.

- Disciplinas Cursadas

O Programa de Mestrado da EEFEUSP tem como critério para depósito de dissertação o cumprimento de 40 créditos, quando o aluno deve, obrigatoriamente, permear por 3 áreas (Filosofia da Ciência, Metodologia da Pesquisa e Estatística), além daquelas áreas de interesse para a formação acadêmico-científica.

Sobre as disciplinas cumpridas, farei, a seguir, um breve relato e avaliação.

1) EFP5757-5/1: Docência no Ensino Superior em Educação Física e Esporte

Esta disciplina tem caráter obrigatório para os alunos que tem interesse em serem monitores em disciplinas da graduação. Acredito que esta tenha sido a disciplina mais importante dentre todas as cursadas, quando penso em minha formação enquanto pesquisadora, professora e humana. O docente conduziu a disciplina com maestria, os alunos se mantiveram entusiasmados ao longo de todo o semestre, e a interação entre todos os participantes foi intensa. Poder discutir, de forma ampla, o que estamos fazendo com nossa formação, foi de extrema valia para o meu processo de aprendizagem. Além disso, foram inúmeras as técnicas de aula aprendidas. A partir do grande diálogo aberto nessa disciplina, um ano depois surgiu o primeiro encontro filosófico sobre epigenética de nossa Escola, com idealização do docente que, afora a sua curiosidade e intenso respeito pelo o que lhe é estranho, pouca intimidade com o tema tinha.

2) EEF5710-3/1: Seminários Avançados em Educação Física e Esporte

Esta disciplina, pelo caráter mais flexível, tendo palestras sobre diversos assuntos que diziam respeito à grande área da Educação Física, teve papel fundamental na troca de experiências e conhecimentos com colegas de áreas que pouco tenho contato, como a pedagogia do movimento do corpo, ou mesmo o esporte de alto rendimento. Com iniciativas como a dessa disciplina, acredito que podemos fortalecer a área como um todo, através de discussões mais fundamentadas, buscando a interação entre grupos da mesma área.

3) EFP5762-2/1: Metodologias Qualitativas: Etnografia e Histórias de Vida

Disciplina empolgante e que, ao trazer a forma de pensamento, estruturação, sistematização metodológica diferentes das que fazemos na pesquisa quantitativa, teve como principal função a de me reconectar com o humano, redescobrir significados para o meu trabalho.

4) QFL5627-3/1: Filosofia da Ciência (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)

Não tive meu objetivo alcançado com essa disciplina. Por se tratar de Filosofia da Ciência, esperava que houvesse espaço para mais discussões, diálogos e exposição de ideias. Com o formato bastante conservador para uma disciplina que, ao meu ver, deveria fomentar o senso crítico, não tive forte empatia com o curso.

5) EFB5755-4/1: Efeitos do Exercício Físico no Metabolismo Muscular

Disciplina que aparece como aprofundamento dos ensinamentos obtidos na graduação, me foi valiosa por me permitir voltar a desbravar a Bioquímica aplicada ao exercício, matéria que muito me fascina.

6) MAE5755-7/3: Métodos Estatísticos Aplicados às Ciências Biológicas (Instituto de Matemática e Estatística - Universidade de São Paulo)

Escutar sobre Estatística através de estatísticos foi o que me moveu a escolher cursar essa disciplina. Com um dos professores, pude aprender um pouco sobre a forma de pensamento que um não-estatístico deve ter para cometer menos erros experimentais. Já com o outro docente, aprendi a aplicar com segurança, ainda que de forma simples, as análises estatísticas que foram usadas nesse estudo.

7) MPT5794-1/5: Ultra-Estrutura e Função Celular (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)

Disciplina singular, me despertou para pensamentos que eu não havia dito até então sobre comunicação celular, meio extracelular, e as aventuras das moléculas que permeiam as nossas células. Foi absolutamente incrível ter um panorama micro da disposição dos sistemas biológicos.

8) ICB5739-1/2: Papel dos MicroRNAs em Processos Fisiológicos e Patológicos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)

Essa disciplina veio como uma oportunidade interessante de estudar de forma sistematizada aquilo que venho conhecendo no laboratório desde 2012. Considerando a falta de base em biologia molecular da grade curricular da Educação Física, pensei ser pertinente ter a oportunidade de cumprir uma disciplina sobre o meu principal tema de estudo. Além disso, ter a oportunidade de conhecer outros alunos e

professores que estudam microRNAs nas mais diversas aplicações dentro da USP foi bastante enriquecedor, aumentando as discussões sobre o assunto mesmo dentro do laboratório ao qual faço parte.