ELAINE CASTILHO GUEDES

**“ANÁLISE DO MICRORNA-22 NA HIPERTROFIA CARDÍACA
INDUZIDA PELA DIETA HIPERLIPÍDICA”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

ELAINE CASTILHO GUEDES

**“ANÁLISE DO MICRORNA-22 NA HIPERTROFIA CARDÍACA
INDUZIDA PELA DIETA HIPERLIPÍDICA”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Placoná Diniz

Versão original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Guedes, Elaine Castilho.

Análise do microRNA-22 na hipertrofia cardíaca induzida pela dieta hiperlipídica / Elaine Castilho Guedes. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Gabriela Placoná Diniz.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Papel dos microRNAs nas alterações cardiovasculares induzidas pela dieta rica em gordura.

Versão do título para o inglês: Analysis of microRNA-22 on cardiac hypertrophy induced by high fat diet.

1. Obesidade 2. Dieta hiperlipídica 3. Hipertrofia cardíaca 4. Remodelamento cardíaco 5. miRNA 6. miRNA-22 I. Diniz, Profa. Dra. Gabriela Placoná II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB023/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Elaine Castilho Guedes.

Título da Dissertação: Análise do microRNA-22 na hipertrofia cardíaca induzida pela dieta hiperlipídica.

Orientador(a): Profa. Dra. Gabriela Placoná Diniz.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	--

Decl. CEUA.001/2014.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 097/13/CEUA, datado de 30.08.13, e por solicitação da Profa. Dra. **Gabriela Placoná Diniz**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Elaine Castilho Guedes** ao Projeto de Pesquisa "*Efeito da dieta rica em gordura no padrão de expressão de microRNAs no tecido cardíaco*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 13 de janeiro de 2014.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da CEUA

ICB/USP

Ao meu querido Douglas,
cujo incondicional apoio e infindável paciência foram
essenciais para que eu conseguisse realizar este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e amiga Gabi, que acreditou em mim desde o início, sempre me ajudando nas dificuldades e compartilhando os bons momentos, mesmo à distância. Agradeço imensamente pela confiança e, acima de tudo, pelo carinho e respeito com os quais me recebeu em seu grupo de trabalho.

Aos meus queridos amigos do LBCAF, (Carol, Ivson, Marina, Ana Taniguchi, Ana Takano, Nathália, Luana, Camila, Denício e Sônia), que estiveram sempre dispostos a me ajudar e a compartilhar conhecimentos. Vocês tornaram os meus dias de trabalho no laboratório muito mais felizes e gratificantes!

À professora Maria Luiza, por disponibilizar toda a estrutura do laboratório para execução deste projeto e por nos incentivar a continuar amando a pesquisa, apesar de todas as dificuldades.

Aos colaboradores, Dr. Pedro A. F. Galante, Gustavo S. França e Fernanda C. Koyama, pela ajuda na execução e análise dos resultados de Sequenciamento de RNA, à Dra. Maria Cláudia Irygoyen e Diego Figueroa, pela realização das análises ecocardiográficas e à Profa. Dra. Maria Luiza M. B. Chaves e Ivson Bezerra da Silva pela realização dos experimentos de Isquemia e Reperfusão.

Aos meus queridos familiares e amigos, pelo amor incondicional e suporte em todos os momentos mais difíceis. E, especialmente à minha doce mãe Hilda e ao meu querido marido Douglas, que sempre estiveram ao meu lado, comemorando comigo cada conquista e me amparando durante as dificuldades.

Aos nossos animais de experimentação, sem os quais este trabalho jamais teria sido realizado. É uma pena que não saibam o quão importante foram e continuam sendo para o desenvolvimento da Ciência. À vocês, minha eterna gratidão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo financiamento do projeto.

A teoria sem a prática vira 'verbalismo', assim como a prática sem a teoria, vira 'ativismo'. No entanto, quando se une a prática com a teoria tem-se a práxis, a ação criadora e modificadora da realidade.

Paulo Freire

RESUMO

GUEDES, E. C. **Análise do microRNA-22 na hipertrofia cardíaca induzida pela dieta hiperlipídica.** 2016. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Recentes estudos têm revelado o envolvimento de microRNAs (miRNAs) no controle da hipertrofia cardíaca e na função do miocárdio. Ainda, várias pesquisas têm demonstrado que o consumo de dieta rica em gordura pode induzir hipertrofia e remodelamento cardíaco. No presente estudo, investigou-se o efeito de dietas contendo diferentes porcentagens de gordura na expressão do miRNA-22, um miRNA que está diretamente envolvido na regulação da morfologia e da função cardíaca e um importante mediador da hipertrofia e falência cardíaca deflagradas por diferentes estímulos. Para isso, camundongos C57BL/6 machos, com idade entre 4 e 5 semanas, foram alimentados com uma dieta controle (10% das calorias provenientes de lipídeos) ou dietas hiperlipídicas (HF) contendo 45% de kcal de gordura (HF45%) e 60% de kcal de gordura (HF60%) por 10 ou 20 semanas. A dieta HF60% promoveu um aumento do peso corpóreo, aumento dos níveis de glicose, insulina, leptina, colesterol total e triglicérides e induziu intolerância a glicose. As dietas HF promoveram remodelamento cardíaco, conforme evidenciado pelo aumento no diâmetro transversal dos cardiomiócitos e deposição de colágeno. A análise de sequenciamento de RNAs demonstrou que as dietas ricas em gordura induziram padrões distintos de expressão de miRNAs no coração, incluindo o miRNA-22. Análise de bioinformática identificou a caveolina-1 como potencial alvo do miRNA-22 e seus níveis encontraram-se aumentados no grupo HF60% tratado por 20 semanas. Considerando que o miRNA-22 está envolvido no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca e falência do coração, é possível que algumas destas alterações estruturais e funcionais cardíacas induzidas pela dieta rica em gordura sejam, ao menos em parte, influenciadas pelo aumento da expressão deste miRNA. Entretanto estudos funcionais são necessários para determinar a contribuição do miRNA-22 para os efeitos promovidos pela dieta rica em gordura no coração.

Palavras-chave: Obesidade. Dieta Hiperlipídica. Hipertrofia Cardíaca. Remodelamento Cardíaco. miRNA. miRNA-22.

ABSTRACT

GUEDES, E. C. **Analysis of microRNA-22 on cardiac hypertrophy induced by high fat diet.** 2016. 87 p. Masters thesis (Morphological Sciences) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Recent studies have revealed the involvement of microRNAs (miRNAs) in the control of cardiac hypertrophy and myocardial function. In addition, several reports have demonstrated that high fat (HF) diet induces cardiac hypertrophy and remodeling. In the current study, we investigated the effect of diets containing different percentages of fat on the miRNA-22 expression, which is a miRNA involved in the control of the cardiac morphology and function and an important mediator of cardiac hypertrophy and heart failure triggered by different stimuli. To address this question, 4-week-old male C57Bl/6 mice were fed with a low fat diet (10 kcal% fat) or high fat diets (HF), containing 45 kcal% fat (HF45%) and 60 kcal% fat (HF60%) for 10 and 20 weeks. HF60% diet promoted an increase on body weight, fasting glycemia, insulin, leptin, total cholesterol, triglycerides and induced glucose intolerance. HF feeding promoted cardiac remodeling, as evidenced by increased cardiomyocyte transverse diameter and interstitial fibrosis. RNA sequencing analysis demonstrated that HF feeding induced distinct miRNA expression patterns in the heart, including miRNA-22. Bioinformatics analysis identified caveolin-1 as a potential target of miRNA-22 and its levels were increased in HF60% group treated for 20 weeks. Considering that miRNA-22 is involved in the development of cardiac hypertrophy and heart failure, it is possible that some of the cardiac structural and functional alterations induced by high fat diet are, at least in part, influenced by the increased expression of this miRNA. However functional studies are needed to determine the contribution of miRNA-22 in the effects promoted by high fat diet in the heart.

Keywords: Obesity. High Fat Diet. Cardiac Hypertrophy. Cardiac Remodeling. miRNA. miRNA-22.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização genômica dos miRNAs	20
Figura 2. Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs	22
Figura 3. MiRNAs envolvidos em processos patológicos	24
Figura 4. Sequência e localização cromossômica do miRNA-22	25
Figura 5. Descrição esquemática da técnica de RT-PCR TaqMan	39
Figura 6. Efeito da dieta controle e das dietas hiperlipídicas na ingestão de água	41
Figura 7. Efeito da dieta controle e das dietas hiperlipídicas na ingestão de ração	42
Figura 8. Efeito das diferentes dietas sobre a ingestão de calorias	43
Figura 9. Análise do ganho de peso corpóreo semanal – grupo 10 semanas	44
Figura 10. Análise do ganho de peso corpóreo semanal – grupo 20 semanas	45
Figura 11. Imagem de raio X representativo e quantificação da área de gordura abdominal	46
Figura 12. Análise dos níveis de triglicérides e colesterol total	48
Figura 13. Análise da glicemia e dos níveis de insulina	49
Figura 14. Análise dos níveis de leptina e adiponectina	50
Figura 15. Ensaio de tolerância à glicose intraperitoneal (iGTT) e área sob a curva	51
Figura 16. Cálculo do índice HOMA-IR	52
Figura 17. Análise da hipertrofia cardíaca induzida pela dieta rica em gordura	53
Figura 18. Análise do diâmetro transverso de cardiomiócitos	54
Figura 19. Análise da quantificação de colágeno no coração	55
Figura 20. Correlação linear de Pearson entre massa cardíaca e peso corpóreo	55
Figura 21. Parâmetros ecocardiográficos	56-57
Figura 22. Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP)	58
Figura 23. Primeira derivada positiva de pressão por tempo (+dP/dt)	59
Figura 24. Primeira derivada negativa de pressão por tempo (-dP/dt)	60
Figura 25. Área de infarto (%) e cortes transversais de corações corados com TTC	61
Figura 26. Heatmap dos miRNAs diferencialmente expressos no coração	62-63

Figura 27. Análise da expressão do miRNA-22-5p	65
Figura 28. Análise da expressão do miRNA-22-3p	65
Figura 29. Correlação linear de Pearson entre massa cardíaca e níveis do miRNA-22	66
Figura 30. Esquema representativo do resultado da análise preditiva <i>in silico</i>	67
Figura 31. Análise dos níveis de mRNA de Caveolina-1 e Caveolina-3	68
Figura 32. Análise dos níveis protéicos de Caveolina-1 e Caveolina-3	69
Figura 1A. Imagem representativa da análise do diâmetro transversal de cardiomiócitos	86
Figura 1B. Imagem representativa da deposição de colágeno no coração	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da tabela nutricional em kcal das diferentes dietas	31
Tabela 2. Sequência dos <i>primers</i> utilizados nos ensaios de Real Time RT-PCR	37
Tabela 3. Sequência dos miRNAs maduros utilizados na quantificação do miRNA-22	38
Tabela 4. Principais características dos programas utilizados na análise preditiva	40
Tabela 5. Análise da massa de tecido adiposo epididimal	47
Tabela 6. Análise da massa do fígado e dos pulmões	47
Tabela 7. Alteração na abundância de miRNAs no coração	62
Tabela 8. Dois potenciais alvos do miRNA-22	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AT1** – receptor de Angiotensina II tipo 1
- CDK6** – quinase 6 dependente de ciclina
- cDNA** – DNA complementar
- DGCR8** – região crítica do gene 8 na síndrome DiGeorge
- DNA** – ácido desoxirribonucleico
- Drosha** – RNase do tipo III
- ELISA** – ensaio imunoenzimático (do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
- GAPDH** – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- HCCS1** – supressor de carcinoma hepatocelular do tipo 1
- HIC1** – supressor de tumor hipermetilado em câncer do tipo 1
- HIF-1 α** – subunidade 1 α do fator de transcrição heterodimérico induzido por hipóxia
- KCTD11** – canal de potássio portador de domínio de tetramerização 11
- NADH** – desidrogenase envolvida na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria
- PGC-1 α** – coativador-1 'alfa' do receptor ativado por proliferador do peroxissoma
- PI3K** – enzima fosfatidil-inositol-3-quinase
- PPARs** – família de receptores nucleares ativados por proliferador do peroxissoma
- PTEN** – fosfatase homóloga à tensina
- RNA** – ácido ribonucleico
- RT-PCR** – reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
- RXR** – receptor de retinóide X
- Serca2a** – Ca²⁺ - ATPase do retículo sarcoplasmático
- SIRT1** – sirtuína 1
- TP53** – supressor de tumor p53
- TRBP** – proteína ligante de RNA
- USP6** – peptidase ubiquitina-específica 6
- XAF1** – fator 1 associado à XIAP, que é um regulador de apoptose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Obesidade	16
1.2 Obesidade e as doenças cardiovasculares	17
1.3 MiRNAs	18
1.3.1 <i>Descoberta e características gerais dos miRNAs</i>	18
1.3.2 <i>Biogênese e mecanismos de ação dos miRNAs</i>	21
1.4 MiRNAs e o sistema cardiovascular	22
1.5 MiRNA-22	24
1.5.1 <i>MiRNA-22 e o sistema cardiovascular</i>	26
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Estabelecimento do modelo experimental	31
4.2 Análise da quantidade de gordura corpórea abdominal	32
4.3 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (iGTT)	32
4.4 Cálculo do índice de HOMA (Homeostasis Model Assessment)	33
4.5 Análise dos níveis de glicose, insulina, leptina, adiponectina, colesterol e triglicerídeos	33
4.6 Avaliação da morfologia e da função do coração	33
4.6.1 <i>Análise da hipertrofia cardíaca induzida pela dieta rica em gordura</i>	33
4.6.2 <i>Análises histológicas</i>	34
4.6.3 <i>Análises ecocardiográficas</i>	34
4.6.4 <i>Ensaio de isquemia/reperfusão (I/R)</i>	35
4.7 Análise da expressão gênica por Real Time RT-PCR	36
4.8 Sequenciamento de RNAs	37

4.9 Quantificação do miRNA-22 por RT-PCR TaqMan	38
4.10 Predição <i>in silico</i> dos transcritos alvos do miRNA-22	39
4.11 Forma de análise dos resultados	40
5 RESULTADOS	41
5.1 Estabelecimento do Modelo Experimental	41
5.1.1 <i>Análise do consumo de água, de ração e de ingestão calórica</i>	41
5.1.2 <i>Análise do efeito da dieta hiperlipídica sobre o ganho de peso corpóreo semanal</i>	43
5.1.3 <i>Avaliação do efeito da dieta hiperlipídica sobre a gordura corpórea abdominal</i>	45
5.1.4 <i>Análise da glicemia, colesterol, triglicérides, insulina, leptina e adiponectina no soro</i>	47
5.1.5 <i>Análise do efeito da dieta hiperlipídica sobre a massa e morfologia cardíaca</i>	52
5.2 Efeito da dieta hiperlipídica sobre o padrão de expressão de miRNAs por sequenciamento	61
5.2.1 <i>Análise da expressão do miRNA-22 por RT-PCR TaqMan</i>	64
5.3 Predição <i>in silico</i> dos transcritos alvos do miRNA-22	66
5.4 Análise da expressão gênica por Real Time RT-PCR	68
5.5 Análise da expressão protéica por Western Blotting	68
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS	77
APÊNDICE A – Análises Histológicas: diâmetro transversal de cardiomiócitos	86
APÊNDICE B – Análises Histológicas: deposição de colágeno	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

Nos últimos 20 anos a prevalência da obesidade aumentou significativamente em todo o mundo, alcançando proporções epidêmicas em alguns países desenvolvidos. Um estudo realizado nos Estados Unidos mostrou que a prevalência da obesidade em 2001 foi de 20,9%, sendo que mais da metade da população adulta foi considerada com sobrepeso (MOKDAD et al., 2003). Pesquisas recentes revelaram que a prevalência da obesidade neste país continua elevada, embora os índices tenham permanecido estáveis entre os anos 2003-2004 e 2009-2010. Segundo um estudo realizado em 2014, cerca de 1/3 dos adultos e 17% dos jovens norte-americanos são considerados obesos (OGDEN et al., 2014). No mesmo sentido, a pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), com dados de 2010, demonstrou pela primeira vez que os índices de desnutrição reduziram e o peso das crianças brasileiras ultrapassou a recomendação internacional estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

O último levantamento da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL, 2014), do Ministério da Saúde (MS), mostrou que 52,5% da população brasileira está acima do peso e destes, 17,9% são obesos. Em 2013, o levantamento apontou que 50,8% dos brasileiros estavam acima do peso e 17,5% eram obesos, demonstrando que, embora os níveis de obesidade tenham se mantido estáveis, houve um aumento na prevalência de sobrepeso no Brasil nos últimos anos.

A obesidade é atualmente um problema de saúde pública, que pode levar ao desenvolvimento de uma série de patologias metabólicas e cardiovasculares, como por exemplo, resistência à insulina, hipertensão, dislipidemia, hiperleptinemia e hipertrofia cardíaca (DONG et al., 2007; MAHAJAN; LAU; SANDERS, 2015). Além disso, a obesidade aumenta a probabilidade de morte prematura e de desenvolvimento de doenças não letais, mas debilitantes, que afetam a qualidade de vida destes indivíduos (PEREIRA; DE FRANCISCHI; LANCHI, 2003).

Vários estudos já mostraram a importância da genética na etiologia da obesidade (FAROOQI; O'RAHILLY, 2006; WABITSCH et al., 2015; WU et al., 2015). No entanto, segundo Pereira, De Francischi e Lanchi (2003) alterações genéticas por si só não explicam o aumento significativo no número de indivíduos obesos nos últimos 20 anos, de forma que, o aumento na prevalência da obesidade tem sido mais atribuído recentemente aos chamados fatores ambientais, em especial, à ingestão alimentar inadequada e à redução no gasto calórico diário.

A ingestão alimentar inadequada pode ser explicada, em parte, pela crescente industrialização da produção alimentícia em países desenvolvidos e emergentes, o que contribui para o aumento no consumo de dietas ricas em gordura e pobres em carboidratos complexos, por exemplo. Em paralelo, a redução no gasto energético está intimamente associada à uma mudança no estilo de vida da população, que passou a ser mais sedentária devido ao maior acesso à facilidades como, meios de transporte motorizados, equipamentos mecanizados e processos automatizados, que exigem menor esforço físico humano (PEREIRA; DE FRANCISCHI; LANCHI, 2003).

1.2 Obesidade e as doenças cardiovasculares

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças do sistema cardiovascular representam a primeira causa de morbidade e mortalidade em humanos, atingindo 16,7 milhões de mortes por ano. No Brasil, a doença cardiovascular (DCV) tem sido a principal causa de mortalidade desde o final dos anos 1960 e é responsável por uma porcentagem substancial de todas as internações no país, sendo que em 2011 a DCV foi a causa de 31% de todas as mortes (RIBEIRO et al., 2016). Estes dados ressaltam assim, a importância da elucidação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nestas patologias para o desenvolvimento de diagnósticos e terapias inovadoras e mais eficazes.

Diversos estudos epidemiológicos evidenciaram que o consumo da dieta ocidental ("*Western diet*"), rica em gordura saturada, gordura trans e açúcar, está intimamente associada ao aumento da prevalência das doenças que acometem o sistema cardiovascular. Nesse sentido, a obesidade induzida pela dieta rica em gordura é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares (WHALEY-CONNELL; SOWERS, 2011).

Evidências clínicas e experimentais têm demonstrado que as alterações nos níveis de leptina e adiponectina apresentam um importante papel na modulação do desenvolvimento e da progressão da hipertrofia cardíaca induzida pela obesidade (BAROUCH et al., 2003; KARMAZYN; GAN; RAJAPUROHITAM, 2013; SHIBATA et al., 2004; XU et al., 2004). No mesmo sentido, há evidências de que a via da insulina, os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), o coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxisoma (PGC-1 α) e o receptor de retinóide X (RXR) são alterados no tecido cardíaco pela dieta rica em gordura (SHARMA et al., 2007), e que além de seus efeitos sobre o metabolismo tecidual, estas proteínas estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (BARGER et al., 2000; FINCK; KELLY, 2007; KARBOWSKA; KOCHAN; SMOLEŃSKI, 2003; MADRAZO; KELLY, 2008) e da disfunção contrátil evidenciada no coração de animais diabéticos (FINCK et al., 2003).

Algumas alterações morfológicas e funcionais cardíacas evidenciadas na obesidade são decorrentes de um aumento na oxidação de ácidos graxos e no consumo de oxigênio, alterações no balanço intracelular de Ca^{2+} , hiperleptinemia e resistência à insulina no tecido cardíaco. Além disso, há indícios de que as alterações cardíacas associadas à obesidade são resultado de disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, da ativação neuro-humoral e da lipotoxicidade que atuam sobre o coração (BALLAL et al., 2010; WISSE; KIM; SCHWARTZ, 2007).

É importante ressaltar que a obesidade também é acompanhada por um remodelamento do tecido cardíaco, o qual se dá através do desarranjo das proteínas contráteis, bem como pela alteração da composição da matriz extracelular (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 2015). Alguns estudos epidemiológicos sugerem também uma importante correlação entre os níveis circulantes de interleucina 6 e o risco de falência cardíaca associada à obesidade (BOUDINA; ABEL, 2010), sugerindo que o processo inflamatório possui um papel relevante no estabelecimento e na progressão das alterações cardiovasculares observadas na obesidade.

Em um estudo com indivíduos obesos, a análise da estrutura cardíaca evidenciou a presença de hipertrofia ventricular esquerda do tipo concêntrica, a qual demonstrou ser independente de alterações na pressão arterial (WOODIWISS et al., 2008). Ainda, há evidências de que a hipertrofia cardíaca desencadeada pela dieta rica em gordura é, ao menos em parte, mediada pelo Sistema Renina Angiotensina (KE et al., 2009), uma vez que o uso de um bloqueador do receptor AT1 foi capaz de atenuar a hipertrofia cardíaca observada na obesidade (DU TOIT; NABBEN; LOCHNER, 2005).

As razões pelas quais o excesso de peso leva ao desenvolvimento de patologias do sistema cardiovascular ainda não estão totalmente esclarecidas. No entanto, estudos recentes experimentais e computacionais têm demonstrado que uma classe de pequenos RNAs não codificantes, os chamados microRNAs (miRNAs), apresentam um importante papel nos processos biológicos associados com a obesidade, incluindo as doenças cardiovasculares (OLSON, 2014; PENG et al., 2014).

1.3 MiRNAs

1.3.1 *Descoberta e características gerais dos miRNAs*

Durante muito tempo todas as regiões não codificantes do genoma, ou seja, as que não apresentam informação direta para síntese de proteínas, foram consideradas como “DNA lixo”. No entanto, estudos recentes revelaram que muitos destes transcritos, conhecidos como RNAs não codificantes (ncRNAs), exercem papel extremamente importante na regulação da expressão gênica.

Dentro deste grupo destacam-se os ncRNAs de cadeia pequena, chamados pequenos RNAs, que incluem RNAs de interferência (siRNA), RNAs de interação Piwi (piRNAs) e microRNAs (miRNAs).

Os miRNAs são curtas moléculas de RNA não codificantes com sequências que variam de 18 a 24 nucleotídeos, capazes de induzir o silenciamento de transcritos específicos de RNAs mensageiros (mRNAs), atuando como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica (BARTEL, 2009; OLENA; PATTON, 2010).

Antes do início da década de 1990, acreditava-se que os miRNAs exerciam um papel relevante apenas em espécies menos complexas. Quando Lee, Feinbaum e Ambros (1993) descobriram que os genes LIN-4 e LIN-14 são importantes para o controle do tempo de desenvolvimento larval no organismo *Caenorhabditis elegans*, esta visão foi rapidamente modificada (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; VAN ROOIJ, 2011). Este estudo foi o primeiro a hipotetizar que uma sequência de ncRNA (lin-4) poderia regular a tradução de um mRNA (lin-14) através da complementaridade de bases, revelando assim, a primeira interação entre um miRNA e seu mRNA alvo. Entretanto, durante 7 anos a descoberta do miRNA lin-4 foi considerada um artefato até a descoberta de um segundo miRNA, chamado let-7, que demonstrou ser capaz de regular a expressão de lin-41, lin-14, lin-28, lin-42 e daf-12 durante desenvolvimento da espécie *C. elegans*. Em adição, descobriu-se a existência de homólogos do let-7 em diversos vertebrados, incluindo o homem, o que mostrou que miRNAs são conservados em muitas espécies e com frequência são ubiquamente expressos (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; ROOIJ, 2011).

Desde então, diversos miRNAs têm sido identificados em diferentes espécies de plantas, algas, vírus e principalmente animais, sendo que mais de 2000 miRNAs já foram descobertos em seres humanos (BARTEL, 2009; HAMMOND, 2015).

De acordo com a localização genômica, os miRNAs podem ser classificados como: intergênicos, intrônicos ou exônicos (Figura 1). Os miRNAs intergênicos são encontrados em diferentes regiões do genoma e possuem uma unidade transcricional independente. Podem ser monocitrônicos, quando apresentam seus próprios promotores, ou policitrônicos, quando vários miRNAs são transcritos como um cluster de transcritos primários com um único promotor compartilhado entre eles (Figura 1A). Frequentemente, estes clusters podem conter miRNAs de diferentes famílias, demonstrando que os miRNAs de um mesmo cluster podem silenciar diferentes mRNAs (YUAN et al., 2009).

As sequências de miRNAs intrônicos podem estar localizadas dentro de íntrons de genes codificantes de proteínas ou não codificantes, podendo ser monocitrônicos ou policitrônicos (Figura 1B). Um caso especial é o mirtron (Figura 1B), no qual o íntron é a exata sequência do pre-miRNA, o que dispensa a etapa de processamento pelo complexo Drosha. Já os miRNAs exônicos são mais

raros e estão localizados na região de fronteira entre um éxon e um íntron de um gene não codificante (OLENA; PATTON, 2010) (Figura 1C).

Figura 1. Localização genômica dos miRNAs. (A) miRNAs Intergênicos; (B) miRNAs Intrônicos e Mirtron; (C) miRNAs Exônicos. Adaptado de Olena e Patton, 2010.

Mecanismos moleculares envolvendo miRNAs são considerados de extrema relevância para a regulação da expressão gênica e acredita-se que juntos os miRNAs sejam capazes de regular cerca de 1/3 do genoma (HAMMOND, 2015).

Atualmente, sabe-se que os miRNAs participam de vários processos biológicos, como por exemplo, metabolismo celular, proliferação celular, apoptose (ABENTE et al., 2016; CHENG et al., 2005; XU; GUO; HAY, 2004) e respostas a estímulos de estresse (DRESIOS et al., 2005; HUANG et al., 2013). Além disso, é cada vez mais evidente que a alteração no padrão de expressão dos miRNAs está relacionada a diversas doenças e, nesse sentido, o perfil de expressão gênica induzido por

miRNAs tem sido considerado como um fator fundamental para o fenótipo resultante de algumas patologias (ABDELLATIF, 2012).

1.3.2 *Biogênese e mecanismos de ação dos miRNAs*

Segundo a via canônica, os genes codificadores dos miRNAs são transcritos a partir do genoma por ação da RNA polimerase II (RNA Pol II), produzindo inicialmente o transcrito primário (pri-miRNA), que apresenta uma estrutura stem-loop e uma sequência longa, com centenas de pares de bases (Figura 2). Ainda nesta etapa, o pri-miRNA recebe a adição de um grupo 7-metil-guanosina (7mG) na sua região 5' (capeamento) e uma cauda poli-A na região 3' (poliadenilação). Posteriormente, o miRNA é clivado por ação do complexo Drosha, formando o precursor de miRNA (pre-miRNA), uma molécula menor (~60-100 nt), dupla-fita e com estrutura hairpin. O complexo microprocessador Drosha é formado pela enzima Drosha e outros cofatores, como a proteína de ligação RNA-dupla-fita, DGCR8 e as proteínas RNA helicases, p68 e p72 (DAVIS-DUSENBERY; HATA, 2010; GREGORY et al., 2004).

O pre-miRNA é exportado do núcleo para o citoplasma através da interação com a proteína Exportina-5 e RanGTPase. Em seguida, ele é clivado próximo à região terminal do loop pelo complexo formado pela Dicer, uma proteína RNase do tipo III, e o cofator TRBP, que estabiliza a interação da Dicer com o pre-miRNA (OLENA; PATTON, 2010). Isto resulta na forma madura do miRNA, que é composta pela fita guia e pela fita passageira, também chamada de fita star (miRNA*), com 18-24 nucleotídeos. Este processo recruta proteínas da família Argonauta (AGO) para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Por sua vez, uma destas fitas se associa ao complexo protéico RISC e, posteriormente, liga-se ao(s) mRNA(s) alvo(s), preferencialmente na região 3' não traduzida (3' UTR). A outra fita será degradada ou poderá se ligar ao RISC e regular um outro mRNA ou ainda, poderá ser exportada para o meio extracelular através de exossomos e microvesículas, tendo ação em outras células (BANG et al., 2014; YANG et al., 2011). Através deste processo, o miRNA irá inibir a tradução do mRNA ou degradá-lo, atuando assim como um regulador pós-transcricional da expressão gênica (Figura 2).

A degradação do mRNA através do complexo RISC pode ser induzida por clivagem endonucleolítica, o que é comumente observado em plantas, em que muitos dos miRNAs são quase completamente complementares a um único ou poucos mRNAs alvos. Já em miRNAs de animais, em geral o reconhecimento dos mRNAs alvos é feito através do pareamento parcial das bases, principalmente na sequência “seed”, que se estende do nucleotídeo da posição 2 até a posição 7 ou 8 do miRNA (HA; KIM, 2014; IWAKAWA; TOMARI, 2015). Esta complementaridade parcial previne o processo de clivagem do mRNA alvo, mas o complexo RISC em animais é capaz de silenciar genes

alvos através do recrutamento de proteínas efetoras adicionais, que induzem a repressão da tradução e/ou a degradação do mRNA, independente da clivagem endonucleolítica (IWAKAWA; TOMARI, 2015).

A natureza imperfeita da ligação miRNA:mRNA, especialmente em animais, faz com que um único miRNA possa potencialmente silenciar diferentes mRNAs, da mesma forma que, um mesmo mRNA possa potencialmente ser alvo de diferentes miRNAs (DAVIS-DUSENBERY; HATA, 2010).

Figura 2. Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs (SONG et al., 2015).

1.4 MiRNAs e o sistema cardiovascular

Uma das principais respostas do coração ao estresse biomecânico e/ou ao estímulo patológico é o remodelamento cardíaco, que corresponde à alteração na estrutura do coração, com mudanças na morfologia das células cardíacas e na composição e deposição da matriz extracelular (MEC), as quais podem resultar em alterações funcionais do coração (HUANG; WANG, 2014; NEPPL; WANG, 2014). Frequentemente a hipertrofia cardíaca ocorre em resposta às condições patológicas, tais como, hipertensão e obesidade, o que eventualmente pode levar à dilatação e falência cardíaca. Este tipo de hipertrofia é chamada de descompensada ou “patológica”. No entanto, o miocárdio também pode sofrer uma forma adaptativa de hipertrofia cardíaca, chamada hipertrofia compensada ou “fisiológica”, que

ocorre em indivíduos saudáveis, por exemplo, em grávidas e atletas, e não está associada ao comprometimento da função cardíaca (KEHAT; MOLKENTIN, 2010; MAILLET; VAN BERLO; MOLKENTIN, 2013).

Diversos estudos já mostraram o envolvimento de vários miRNAs no processo de remodelamento e hipertrofia do coração, bem como no controle da função cardíaca (CHENG et al., 2007; NAGPAL et al., 2015; VAN ROOIJ et al., 2006). Além disso, muitos trabalhos já evidenciaram a participação destas moléculas em outras desordens cardiovasculares, incluindo falência cardíaca, arritmias, aterosclerose, fibrilação atrial e doença arterial periférica (NEPPL; WANG, 2014). MiRNAs também estão implicados em quase todos os processos celulares básicos envolvidos com o funcionamento do coração, tais como proliferação celular, diferenciação, apoptose e angiogênese (OLSON, 2014; THUM et al., 2007; VAN ROOIJ et al., 2006).

A ação dos miRNAs ocorre principalmente através de seus efeitos na regulação de vias importantes relacionadas à manutenção da função e da morfologia cardíaca (GLADKA; DA COSTA MARTINS; DE WINDT, 2012). Assim, através da desestabilização de seus mRNAs alvos, os miRNAs atuam como importantes reguladores da homeostase cardíaca e da resposta do tecido cardíaco aos estímulos de estresse (DORN, 2010).

Embora existam numerosas causas para os diferentes tipos de cardiomiopatias, cada vez mais pesquisas têm mostrado que os miRNAs exercem papel crucial na progressão da disfunção cardíaca e participam diretamente do estabelecimento da hipertrofia e falência cardíaca evidenciadas em alguns modelos, como por exemplo, sobrecarga de pressão e superexpressão de calcineurina no coração (DORN, 2010; NEPPL; WANG, 2014; OLSON, 2014; VAN ROOIJ et al., 2006). Um estudo envolvendo o interrompimento da biogênese dos miRNAs através da deleção do gene da Dicer no coração de camundongos demonstrou que esses animais desenvolviam cardiomiopatia dilatada, falência cardíaca e letalidade pós-natal (CHEN et al., 2008). De forma similar, da Costa Martins et al. (2008) também mostrou que a deleção da Dicer em camundongos provocava morte prematura, a qual é acompanhada de aumento atrial, hipertrofia, fibrose ventricular e reexpressão de genes fetais no miocárdio adulto (DA COSTA MARTINS et al., 2008).

Ainda, a expressão de vários miRNAs aparece alterada em diferentes patologias cardiovasculares, como é o caso do miRNA-29, cujos níveis de expressão se mostram diminuídos nos processos fibróticos que acometem o coração (VAN ROOIJ et al., 2008). Um outro exemplo é o miRNA-208a, que exerce um papel importante na regulação da hipertrofia cardíaca. Em um estudo realizado por Callis et al. (2009), a superexpressão do miRNA-208a no coração de camundongos transgênicos foi suficiente para causar crescimento hipertrófico e induzir arritmia (CALLIS et al., 2009).

No mesmo sentido, outro miRNA envolvido no remodelamento cardíaco e em disfunções do miocárdio é o miRNA-21. Em um modelo de hipertrofia induzida por sobrecarga de pressão, o silenciamento *in vivo* do miRNA-21 atenuou as disfunções cardíacas e inibiu a fibrose intersticial (THUM et al., 2008). Similarmente, o miRNA-378 também é alterado em vários modelos de hipertrofia e falência cardíaca e a redução dos seus níveis de expressão parece estar envolvida nos processos de remodelamento cardíaco (NAGALINGAM et al., 2013). Outros exemplos de miRNAs envolvidos no controle de processos patológicos que acometem o sistema cardiovascular são mostrados na Figura 3.

Além dos miRNAs citados, recentemente estudos independentes têm apontado um importante papel do miRNA-22 na regulação da morfologia e da função cardíaca, além de também já ter sido evidenciada a sua participação na regulação da hipertrofia e da falência cardíaca deflagradas por diferentes estímulos (HUANG et al., 2013).

Figura 3. MiRNAs envolvidos em processos patológicos que acometem o sistema cardiovascular. Adaptado de Olson, 2014.

1.5 MiRNA-22

O primeiro estudo que identificou o gene humano do miRNA-22 foi realizado em 2001 por Lagos-Quintana et al. (2001) através do método de clonagem em células HeLa. Neste estudo, mostrou-se que este gene transcrevia uma sequência pequena de RNA não codificante contendo 22 nucleotídeos (Figura 4A), com alta expressão em diferentes vertebrados (LAGOS-QUINTANA, 2001). Subsequentemente, outros estudos mostraram que o miRNA-22 é ubiquamente expresso em mais de

20 tipos de tecido humano, como por exemplo, cérebro, pulmões, fígado, rins, bexiga, tireóide, tecido adiposo, dentre outros, sendo que sua expressão é relativamente mais elevada no coração, músculo esquelético e tecido adiposo. Ainda, análises genômicas comparativas mostram que este miRNA é evolutivamente conservado no reino animal (XIONG, 2012).

O miRNA-22 humano localiza-se no cromossomo 17p13, dentro do éxon 3 do gene não codificante C17orf91 (Figura 4B). Ele se encontra em uma região frequentemente hipermetilada e próxima à genes supressores tumorais, como por exemplo, HCCS1, DPH1, HIC1, XAF1, KCTD11, incluindo o conhecido gene p53 (TP53); a exceção é o USP6 que corresponde à um oncogene (XIONG, 2012).

Diversos genes têm sido apontados como potenciais alvos do miRNA-22, como por exemplo, receptor de estrógeno α , histona deacetilase 4 (HDAC4), CDK6, SIRT1, Sp1, p21 e fator induzível por hipóxia 1 α (HIF-1 α), sugerindo que o miRNA-22 está relacionado ao desenvolvimento de diversos tipos de cânceres (XIONG, 2012). Além do possível envolvimento do miRNA-22 com a tumorigênese, outras vias biológicas também são influenciadas por este miRNA, dentre as quais se destacam a manutenção das células tronco embrionárias (HOUBAVIY; MURRAY; SHARP, 2003), o metabolismo do tecido cartilaginoso (ILIOPOULOS et al., 2008) e o estado trófico de cardiomiócitos (XU et al., 2012).

Figura 4. A) Sequência do precursor do miRNA-22 (stem-loop). Em rosa, sequência do miRNA-22 maduro. B) Localização cromossômica do miRNA-22. Adaptado de Mirbase, 2016 e Xiong, 2012.

1.5.1 *MiRNA-22 e o sistema cardiovascular*

Estudos desenvolvidos em modelos animais ou em humanos demonstraram a alteração dos níveis do miRNA-22 em diversas doenças cardíacas (GURHA et al., 2013; HARPER et al., 2013; HUANG et al., 2013; HUANG; WANG, 2014; XU et al., 2012), sugerindo que este miRNA pode estar envolvido na regulação de processos patológicos que acometem o coração.

Utilizando camundongos knockouts para o miRNA-22 no coração, Huang et al. (2013) comprovaram que este miRNA é um regulador crítico da hipertrofia cardíaca em resposta ao estresse, uma vez que esses camundongos não desenvolvem hipertrofia cardíaca e remodelamento do tecido em resposta à sobrecarga de pressão ou pela superexpressão de calcineurina no coração. Ao contrário, estes animais rapidamente evoluem para um quadro de remodelamento cardíaco crítico e desenvolvem dilatação cardíaca, a qual é acompanhada por aumento na morte de cardiomiócitos e deposição de tecido fibrótico, características de cardiomiopatia dilatada e falência cardíaca. Os resultados mostraram também que a expressão do miRNA-22 é muito mais alta em corações adultos que em corações de neonatos ou embrionários, sugerindo uma importante função deste miRNA em corações na fase adulta. Ainda, demonstrou-se também que HDAC4, PPAR α , PGC1 α e Sirt1, os quais apresentam importantes funções na fisiologia cardíaca, são alvos do miRNA-22 (HUANG et al. 2013).

Além disso, estudos *in vitro* evidenciaram que a hipertrofia dos cardiomiócitos induzida pela Angiotensina II e pela fenilefrina é acompanhada por um aumento da expressão do miRNA-22 e que a inibição deste miRNA, através do uso de um inibidor específico, foi capaz de atenuar a resposta hipertrófica dos cardiomiócitos induzida por estes estímulos (XU et al., 2012). Adicionalmente, através de um estudo de ganho de função utilizando um mimetizador *in vitro*, também foi demonstrado que o aumento da expressão do miRNA-22 *per se* é capaz de induzir a hipertrofia de cardiomiócitos isolados, evidenciada através de um aumento da área celular e da expressão gênica de marcadores hipertróficos. Este estudo demonstrou ainda que o PTEN, o qual se encontra reduzido em modelos de hipertrofia cardíaca, é um dos alvos do miRNA-22 (KISHIMOTO et al., 2003; XU et al., 2012).

De maneira similar, camundongos transgênicos com aumento da expressão do miRNA-22 no coração apresentam hipertrofia cardíaca. Por outro lado, camundongos knockouts para o miRNA-22 apresentam um prejuízo nas respostas inotrópicas e lusitrópicas em resposta ao estresse e são mais sensíveis à dilatação ventricular, ao remodelamento e ao comprometimento da função cardíaca quando submetidos à sobrecarga de pressão. Além disso, estes animais também apresentam uma diminuição nos níveis de Serca2a e de proteínas do citoesqueleto no coração (GURHA et al., 2012), o que pode estar diretamente relacionado às alterações funcionais e morfológicas cardíacas detectadas nesse modelo. Um outro estudo subsequente conduzido pelo mesmo grupo demonstrou que o aumento da

expressão do miRNA-22 *in vivo* promoveu hipertrofia cardíaca e disfunção contrátil, a qual culminou em falência cardíaca (GURHA et al., 2013). Ainda, o aumento da expressão do miRNA-22 induziu um prejuízo no transiente de Ca^{2+} e alterou a expressão de genes alvos, como o receptor de estrógeno, Sirt 1, PGC-1 α , PPAR α , os quais já demonstraram estar envolvidos no estabelecimento da hipertrofia cardíaca evidenciada em diversos modelos, dentre eles o observado na obesidade (BARGER et al., 2000; FINCK; KELLY, 2007; KARBOWSKA; KOCHAN; SMOLEŃSKI, 2003; MADRAZO; KELLY, 2008).

Considerando que a ativação do PPAR γ no coração possui efeitos benéficos sobre a fisiologia cardíaca (AMIN et al., 2010), e que esta via demonstrou ser alvo do miRNA-22, é possível que parte do prejuízo funcional evidenciado nos camundongos que superexpressam o miRNA-22 seja influenciado pela redução dos níveis de PPAR γ .

Corroborando os estudos que demonstram o envolvimento do miRNA-22 na hipertrofia cardíaca, Harper et al. (2013) testaram alguns tipos de poliformismos de nucleotídeo único (SNPs) que ocorrem próximo ao locus gênico do miRNA-22 e encontraram que um deles estava intimamente ligado à variabilidade de massa do ventrículo esquerdo em grupos de pacientes humanos (HARPER et al., 2013). Ainda, estudos sugerem que o miRNA-22 também pode estar implicado no processo de injúria do miocárdio induzida por isquemia e reperfusão (I/R). Em modelo de I/R utilizando ratos, a superexpressão de miRNA-22 reduziu a apoptose de cardiomiócitos através do silenciamento de um dos seus mRNAs alvos, a proteína de ligação à CREB (CBP) (YANG et al., 2014).

Recentemente demonstrou-se que o miRNA-22 é aumentado no coração durante o envelhecimento e que o aumento de sua expressão em fibroblastos estimula a senescência e a capacidade migratória destas células, indicando que algumas alterações cardíacas evidenciadas no envelhecimento sejam, ao menos em parte, mediadas por este miRNA (JAZBUTYTE et al., 2013). Além disso, o uso de um inibidor do miRNA-22 foi capaz de reduzir a pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (FRIESE et al., 2013), sugerindo que este miRNA também pode exercer outros efeitos no sistema cardiovascular, além dos até então demonstrados em relação ao controle da estrutura e da função cardíaca.

Diante das importantes descobertas do papel do miRNA-22 sobre o sistema cardiovascular, Tu et.al (2013) demonstraram pela primeira vez que a modulação do miRNA-22 pode ser alcançada através de intervenção farmacológica (TU et al., 2013). O fármaco atorvastatina foi capaz de inibir a hipertrofia de cardiomiócitos induzida pelo aumento da expressão de miRNA-22, através da redução dos níveis deste miRNA e do aumento dos níveis de PTEN.

Apesar das evidências recentes apontarem um importante papel do miRNA-22 na resposta cardíaca à diferentes estímulos, até o momento não há estudos que tenham avaliado se o remodelamento cardíaco induzido pela dieta rica em gordura é acompanhado pela alteração deste

miRNA no tecido cardíaco, ou ainda, se o miRNA-22 pode contribuir para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca evidenciada na obesidade.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando que as doenças do sistema cardiovascular representam a primeira causa de morbidade e mortalidade em humanos e que a prevalência da obesidade tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, conforme dados da OMS, torna-se fundamental elucidar os mecanismos celulares e moleculares implicados nestes eventos com o intuito de contribuir futuramente para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e tratamentos mais eficazes para os indivíduos que apresentam alterações cardiovasculares promovidas pela dieta rica em gordura.

Apesar de evidências recentes corroborarem a participação de determinados miRNAs para o estabelecimento de algumas patologias que atuam sobre o sistema cardiovascular, até o momento não se sabe se as alterações na morfologia e na função cardíaca desencadeadas pela dieta rica em gordura são mediadas, ao menos em parte, por miRNAs.

Sabendo-se que o miRNA-22 está diretamente envolvido na regulação da morfologia e da função cardíaca e que este miRNA é um importante mediador da hipertrofia e falência cardíaca deflagrada por diferentes estímulos (HUANG et al., 2013), justifica-se avaliar se o remodelamento cardíaco desencadeado pela dieta hiperlipídica é acompanhado pela alteração na expressão deste miRNA.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo investigar a expressão do miRNA-22 na hipertrofia cardíaca induzida pela dieta hiperlipídica utilizando como modelo animal camundongos machos C57BL/6.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as alterações morfológicas e funcionais cardíacas deflagradas pela dieta rica em gordura;
- Determinar o efeito da dieta rica em gordura nos níveis de triglicérides, glicose, insulina, leptina, adiponectina e colesterol total;
- Avaliar o efeito da dieta rica em gordura na manutenção da homeostase glicêmica e na resistência à insulina;
- Avaliar o efeito da dieta rica em gordura sobre o padrão de expressão de miRNAs no coração;
- Investigar a expressão do miRNA-22 nas alterações cardíacas induzidas pela dieta rica em gordura;
- Verificar a expressão gênica e proteica de dois potenciais alvos do miRNA-22 após análise preditiva, utilizando ferramentas de bioinformática.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estabelecimento do modelo experimental

Os experimentos foram realizados de acordo com a lei federal nº 6638 de 1979, que regulamenta o emprego de animais em experimentação científica, após a aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa da USP (Protocolo número 097/13/CEUA). Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, com idade entre 4 e 5 semanas, obtidos do Biotério da Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (n=5 animais por grupo experimental). Os animais foram acondicionados em gaiolas coletivas, contendo no máximo 5 animais, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de 22 °C e com suplemento de água e alimento *ad libitum*. Considerando-se que os efeitos exercidos pela dieta rica em gordura sobre o tecido cardíaco dependem da composição dos lipídeos da dieta, do tempo de tratamento e da porcentagem de ingestão calórica (NOYAN-ASHRAF et al., 2013), utilizou-se neste projeto dois modelos de dietas hiperlipídicas comerciais (*High Fat 45%* e *High Fat 60%*), fornecidas pela empresa PragSoluções (PragSoluções Biociências, Jaú, SP, Brasil) e dois tempos de tratamento, 10 e 20 semanas (Tabela 1).

Tabela 1. Composição nutricional e calórica das diferentes dietas experimentais:

Componentes	kcal/g ração		
	Dieta Controle	Dieta <i>High Fat 45%</i>	Dieta <i>High Fat 60%</i>
Amido de Milho	1,19	0,34	0
Caseína	0,75	0,93	1,03
Amido Dextrinizado	0,20	0,47	0,65
Sacarose	1,30	0,81	0,36
Óleo de Soja	0,21	0,26	0,29
Celulose Microcristalina	0	0	0
Mix Mineral PSB 10026	0	0	0
Mix Vitamina AIN 93	0,04	0,05	0,05
L-Cistina	0,01	0,01	0,01
Bitartarato de Colina	0	0	0
BHT	0	0	0
Fosfato de Cálcio Bibásico	0	0	0
Carbonato de Cálcio	0	0	0
Citrato de Potássio	0	0	0
Banha	0,17	1,86	2,85
TOTAL	3,87	4,73	5,24

Dieta Controle: 70% de carboidratos, 20% de proteínas e 10% de lipídeos / Dieta High Fat 45%: 35% de carboidratos, 20% de proteínas e 45% de lipídeos / Dieta High Fat 60%: 20% de carboidratos, 20% de proteínas e 60% de lipídeos.

O primeiro modelo refere-se à utilização de uma dieta rica em gordura com 45% das calorias provenientes de lipídeos (HF45%), com tempo de tratamento de 10 e 20 semanas, o qual é amplamente utilizado para investigação das alterações cardiovasculares promovidas pela dieta hiperlipídica (HUA et al., 2013; NOYAN-ASHRAF et al., 2013; TURDI et al., 2011). Ainda, considerando que alguns pesquisadores também utilizam um modelo de dieta hiperlipídica com 60% das calorias provenientes de lipídeos (HF60%), no intuito de elucidar alterações metabólicas evidenciadas nesse modelo (GRUETER et al., 2012; WILSON et al., 2007) e, que o seu potencial efeito sobre o tecido cardíaco ainda não está totalmente esclarecido (CHESS et al., 2008; OKERE et al., 2006), também foi investigado se a obesidade induzida por esta dieta é capaz de modular a expressão do miRNA-22 no tecido cardíaco após 10 e 20 semanas de tratamento. Já o grupo controle foi submetido à dieta padrão, contendo 10% das calorias provenientes de lipídeos.

Os conteúdos de proteínas, vitaminas e minerais nas dietas foram similares entre os três grupos, de acordo com a recomendação do *American Institute of Nutrition* (AIN-93G) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). A ingestão de água e comida, bem como o peso corpóreo dos animais foram monitorados semanalmente ao longo do tratamento.

4.2 Análise da quantidade de gordura corpórea abdominal

Os animais foram submetidos ao imageamento *in vivo* para avaliar a quantidade de gordura corpórea abdominal junto ao Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP-USP) ao final dos protocolos experimentais. As imagens de raio-X foram capturadas para quantificação do tecido adiposo abdominal utilizando *In-Vivo Imaging System FX PRO* (Carestream). A porcentagem de gordura corpórea abdominal foi calculada através da razão entre a área abdominal e a área corpórea total, normalizados pelo comprimento da tíbia.

4.3 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (iGTT)

Após 12 horas de jejum, os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose intraperitoneal, de acordo com o protocolo descrito por Cintra et al. (2012) e Turdi et al. (2011). Inicialmente avaliou-se a glicemia de jejum (tempo 0) com uso do glicosímetro Chek® Active (Roche-Diagnostics, Mannheim, Alemanha) e, em seguida, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de glicose (2 g/kg de animal). Amostras de sangue foram coletadas da veia caudal e a concentração de glicose foi mensurada após 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. Os resultados foram apresentados

através de gráficos de curva glicêmica (*Software GraphPad Prism* versão 5) e através do cálculo da área sob a curva (*Software Origin* versão 7).

4.4 Cálculo do índice de HOMA (Homeostasis Model Assessment)

O modelo homeostático de resistência insulínica (HOMA-IR) é um método indireto de avaliação da sensibilidade à insulina que utiliza os valores de glicemia e insulinemia basais em seu cálculo. O índice HOMA-IR foi calculado para avaliar a resistência à insulina nos camundongos submetidos às diferentes dietas após 10 e 20 semanas. Seu valor foi calculado através da multiplicação do valor da glicemia em jejum (mmol/L) pelo valor da insulinemia em jejum (mU/L) e o produto desta equação foi dividido pela constante 22,5, como demonstrado na fórmula descrita a seguir (MATTHEWS et al., 1985).

$$HOMA - IR = \frac{(IJ \times GJ)}{22,5}$$

IJ é a insulinemia em jejum e GJ é a glicemia em jejum

4.5 Análise dos níveis de glicose, insulina, leptina, adiponectina, colesterol e triglicerídeos

Um dia antes do término do experimento os animais foram privados de alimento à noite e então, eutanasiados no dia seguinte pela manhã, utilizando-se câmara de CO₂. O sangue foi rapidamente coletado e centrifugado para obtenção do soro (3000 rpm, 15 minutos, 4°C). Os níveis de leptina, insulina e adiponectina foram avaliados por Ensaio Imunoabsorvente ligado à Enzima (ELISA) (EZRL-83K, EZRMI-13K e EZRADP-62K, respectivamente, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Já os níveis de colesterol total e triglicerídeos foram avaliados por kits de reação enzimática colorimétrica (439-17501 e 461-08992, WakoDiagnostics, EUA). A glicemia foi medida antes da eutanásia com uso de glicosímetro Chek® Active (Roche-Diagnostics, Mannheim, Alemanha).

4.6 Avaliação da morfologia e da função do coração

4.6.1 Análise da hipertrofia cardíaca induzida pela dieta rica em gordura

Após a eutanásia dos animais, a gordura epididimal, o coração, o fígado e os pulmões foram removidos e pesados. O peso do coração foi dividido pelo comprimento da tíbia (mg/mm), com o intuito

de avaliar o efeito da dieta hiperlipídica sobre o trofismo cardíaco. Paralelamente, através da técnica de Real Time RT-PCR (seção 4.7 de Materiais e Métodos) foi realizada a análise da expressão gênica dos seguintes marcadores de hipertrofia cardíaca: miosinas de cadeia pesada do tipo α (α -MHC) e do tipo β (β -MHC), peptídeo natriurético cerebral (BNP) e α -actina esquelética (SCHAUB et al., 1997).

4.6.2 Análises histológicas

Análises histológicas foram realizadas com o intuito de caracterizar o remodelamento cardíaco induzido pela dieta hiperlipídica. Os corações obtidos (n=3) foram processados através de fixação em formaldeído 10% por um período de 24 a 48 horas e, posteriormente, armazenados em álcool etílico 70%. Após a fixação, os tecidos passaram pelas etapas de desidratação, diafanização e parafinização:

1 – Desidratação: o tecido passou por uma bateria de álcool etílico com concentrações crescentes (70% - 100%);

2 – Diafanização: nesta etapa os tecidos foram banhados em xilol para garantir a total impregnação da parafina no tecido;

3 – Parafinização e corte: os tecidos foram colocados em parafina e após solidificação foram cortados no micrótomo em seções de aproximadamente 5 μ m, sendo preparadas de 10 a 15 lâminas para cada coração;

4 – Coloração: cinco lâminas de cada amostra foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para mensurar o diâmetro transversal dos cardiomiócitos e cinco lâminas de cada amostra também foram coradas com Tricoma de Masson para avaliar potenciais áreas fibróticas. Após coradas, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas, montadas com lamínulas e analisadas no microscópio Nikon Eclipse E600/ NIS – Elements AR.

O diâmetro transversal dos cardiomiócitos foi medido na altura do núcleo, apenas nas células que continham o núcleo íntegro e no centro do cardiomiócito.

A porcentagem da área fibrótica total foi calculada como a soma das áreas marcadas em azul dividida pela área ventricular total (TEEKAKIRIKUL et al., 2010). Ambas as análises foram feitas utilizando o Imaging Software Nikon NIS Elements.

4.6.3 Análises ecocardiográficas

A morfologia e a função cardíaca foram avaliadas através de análises ecocardiográficas, em colaboração com a equipe da Profa. Dra. Maria Cláudia Costa Irigoyen, no Instituto do Coração (INCOR). Os animais foram anestesiados com uso de isoflurano (concentração 1,5 a 2,5%) e as

análises realizadas conforme recomendação da American Society of Echocardiography. As imagens foram obtidas com um transdutor linear 10- a 14- mHz em um SEQUOIA 512 (ACUSON Corp, Mountain View, CA) para aquisição dos seguintes parâmetros: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (LVEDD), diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (LVESD), espessura relativa da parede e fração de encurtamento (FS). A fração de encurtamento foi calculada pela seguinte fórmula: $(LVEDD - LVESD) / LVEDD \times 100$. A espessura relativa da parede foi calculada a partir da dimensão da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (LVPWD) e a partir de LVEDD, através da seguinte fórmula: $(2 \times LVPWD / LVEDD)$.

4.6.4 Ensaio de isquemia/reperfusão (I/R)

Os ensaios de I/R foram realizados em colaboração com a equipe da Profa. Dra. Maria Luiza M. Barreto de Chaves, do Departamento de Anatomia, do ICB-USP.

Após os corações serem excisados e limpos em solução modificada de Krebs-Henseleit (KH) contendo: NaCl (118 mM), KCl (4.7 mM), CaCl_2 (1.75 mM), MgSO_4 (1.66 mM), NaHCO_3 (24.88 mM), KH_2PO_4 (1.18 mM), dextrose 2 g/L e água bi-distilada, o pH foi ajustado para 7,4 por contínua gaseificação com uma mistura de 95% de O_2 e 5% de CO_2 . Em seguida, os corações foram rapidamente montados no Sistema de Langendorff (Radnoti – ADInstruments, EUA) e perfundidos retrogradamente, de acordo com o Método de Langendorff (LANGENDORFF, 1895), através da aorta ascendente, em solução KH, a 37 °C, a fluxo constante de 3 mL / min e sem recirculação. Menos de 3 minutos foi o tempo utilizado entre a retirada do coração do animal e a canulação da aorta no sistema. Quando o período de preparação excedeu esse tempo, o coração foi descartado.

Todos os corações foram submetidos ao processo de I/R obedecendo a um protocolo experimental de 30 minutos de estabilização, 20 minutos de isquemia global (fluxo=0) e posterior restauração do fluxo, com 45 minutos de reperfusão (CASTRO et al., 2005). A dP/dt máxima e dP/dt mínima, que são índices de contratilidade e de relaxamento do coração, respectivamente, foram monitorados continuamente por um sistema de registro (PowerLab-Lab Chart 7, ADInstruments, EUA).

Ao término do período de reperfusão cortou-se uma secção transversal dos dois ventrículos (cerca de 2-3 mm), na altura da distância média entre o ápice e a base. A secção cardíaca foi imersa por 15 minutos numa solução tamponada (pH 7.4) de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 1% e a 37 °C. Essa solução levou à formação de um aspecto vermelho escuro das áreas cardíacas viáveis, o que ocorre em virtude do TTC reagir com as moléculas de NADH_2 e também com outras enzimas desidrogenases presentes nos tecidos viáveis. As áreas necróticas, por outro lado, apresentaram-se pálidas, uma vez que durante a reperfusão ocorre a lavagem destas regiões, sendo que a ausência de moléculas de

NADH₂ e enzimas desidrogenases não permitem a ocorrência da reação química. Após a coloração, os cortes foram imersos em solução de formol 10% por 24 h a 4 °C, permitindo um maior contraste entre as diferentes regiões. Posteriormente esses cortes foram escaneados e quantificados pelo programa *ImageJ* (versão 1.6.0).

O cálculo da porcentagem de área infartada foi feito através da razão entre a área infartada sobre a área cardíaca total analisada: (área infartada X 100 / área cardíaca total).

4.7 Análise da expressão gênica por Real Time RT-PCR

O RNA total do coração (n=5 por grupo experimental) foi extraído utilizando-se um reagente à base de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol, Invitrogen, EUA). A qualidade da extração foi avaliada através da análise da razão das absorbâncias obtidas em $\lambda=260$ nm e $\lambda=280$ nm e a concentração das amostras foi determinada em espectrofotômetro de alta sensibilidade, através de um programa específico para análise de ácidos nucleicos (Gen5 Data Analysis Software, BioTek, EUA). A integridade do RNA extraído foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose (1%), contendo brometo de etídio, com avaliação de duas subunidades de RNA ribossomal (18S e 28S), sob luz UV.

A reação de transcrição reversa foi feita utilizando-se a enzima SuperScriptTM (Invitrogen, EUA) em termociclador (MJ Research–PTC 200), de acordo com as instruções do fabricante. Já a reação de PCR foi realizada utilizando-se SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen, EUA) e a expressão gênica dos marcadores de hipertrofia foi determinada através da fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo $\Delta\Delta C_t = (\Delta C_t \text{ Tratado} - \Delta C_t \text{ Controle})$ e $\Delta C_t = (C_t \text{ gene interesse} - C_t \text{ controle interno})$. Inicialmente foi avaliada a expressão de quatro genes que são normalmente utilizados como controles endógenos, a β -actina, o GAPDH, o 18S e a ciclofilina (Ppia), no intuito de identificar o gene endógeno mais adequado para a normalização dos ensaios de expressão gênica. Os resultados obtidos foram expressos com base na relação do mRNA de cada gene de interesse com os níveis de mRNA do gene normalizador. Os melhores controles endógenos foram o GAPDH e a ciclofilina, cujos resultados foram muito similares. Desta forma, o GAPDH foi selecionado como gene normalizador, uma vez que o mesmo também foi utilizado nos ensaios de normalização por Western Blotting.

As sequências dos primers utilizados encontram-se descritas na tabela abaixo (Tabela 2):

Tabela 2. Sequência dos primers utilizados nos ensaios de PCR em tempo real:

Genes	Sequência Sense	Sequência Anti-Sense
BNP	CAGCTCTTGAAGGACCAAGG	AGACCCAGGCAGAGTCAGAA
α-MHC	TGACGTCACCTCCAACATGG	CCAACTCCCCGTTCTCTGTC
β-MHC	ATTGGTGCCAAGGGCCTGAAT	GCTTCCACCTAAAGGGCTGTTG
α-actina	GGCAAGATGAGAGTCCACAA	CGGAGAATGATGGTCCAGAT
Caveolina-1	GTTGCCCTCACAGGGACAT	TCAAAGTCAATCTTGACCACGTC
Caveolina-3	TCAATGAGGACATTGTGAAGGTAG	TAGACAACAGGCGGTAGCAC
GAPDH	ACTCCACTCACGGCAAATTC	TCTCCATGGTGGTGAAGACA

4.8 Sequenciamento de RNAs

Em colaboração com a equipe do Dr. Pedro Galante, do Hospital Sírio-Libanês, foi possível avaliar o padrão de miRNAs alterados no coração em resposta às dietas hiperlipídicas. Inicialmente os miRNAs dos corações foram extraídos utilizando-se o kit mirVana™ miRNA Isolation (Life Technologies, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. Triplicatas biológicas para cada grupo foram usadas para construção da biblioteca de pequenos RNAs, usando o kit SOLiD Total RNA-Seq (Life Technologies, EUA), conforme recomendações do fabricante.

O sequenciamento foi realizado usando 5500xl SOLiD™ System platform (Life Technologies, EUA) e os reads foram alinhados no genoma de camundongo (mm10) com uso do programa Bowtie 1.0.0 (LANGMEAD et al., 2009), usando os seguintes parâmetros: -m 5 -v 0 -a -best -strata. Reads alinhados em mais de 5 loci diferentes foram descartados (-m 5). Os adaptadores 3' foram removidos usando a estratégia de trimagem sequencial (MARCO; GRIFFITHS-JONES, 2012). Reads que apresentaram sobreposição completa com as sequências de miRNAs maduros provenientes do banco de dados miRBase (release 20) foram contados para obtenção dos níveis de expressão. Como os miRNAs maduros frequentemente exibem heterogeneidade na borda 3', foram permitidos 2 nucleotídeos de extensão nesta região. Para normalizar a expressão de miRNAs maduros derivados de diferentes precursores, reads mapeados em mais de uma região genômica foram aleatoriamente atribuídos a um dos respectivos loci. Para detectar os miRNAs diferencialmente expressos em resposta à dieta hiperlipídica, o total de reads mapeados em cada um dos miRNAs maduros foi normalizado entre as amostras e testado para avaliação da expressão diferencial entre grupos, incluindo todas as replicatas (Controle vs HF45%, Controle vs HF60% e HF45% vs HF60%, grupos 10 e 20 semanas),

usando o pacote estatístico EdgeR 2.6.12 (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010). Para excluir os miRNAs com níveis muito baixos de expressão, utilizou-se um valor de corte (threshold) de > 1 cpm (contagens de reads por milhão) para os miRNAs expressos em pelo menos 30% das amostras. Os miRNAs diferencialmente expressos foram selecionados usando um cutoff de FDR (false discovery rate) $< 0,05$.

4.9 Quantificação do miRNA-22 por RT-PCR TaqMan

A quantificação do miRNA-22 foi realizada através de uma transcrição reversa denominada de “stem-loop RT”, seguida da análise por PCR TaqMan (Figura 5), o que torna a análise da expressão do miRNA mais sensível e específica quando comparada a outros métodos (CHEN et al., 2005). Os pequenos RNAs foram isolados utilizando-se o kit mirVana™ (AM1560, Ambion, Austin, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. O cDNA específico do miRNA-22 foi obtido através da utilização do kit TaqMan® MicroRNA RT (Applied Biosystems, EUA). Em seguida, utilizou-se um primer específico para a análise da expressão do miRNA-22 (4427975, Applied Biosystems, EUA), através da técnica de Real Time RT-PCR, com a quantificação realizada através da fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ Tratado} - \Delta Ct \text{ Controle})$ e $\Delta Ct = (Ct \text{ gene interesse} - Ct \text{ controle interno})$. A expressão do miRNA-22 foi normalizada pela expressão de U6 snRNA (4395470, Applied Biosystems, EUA), um pequeno RNA que tem sido amplamente utilizado como normalizador dos níveis de miRNAs (DINIZ; TAKANO; BARRETO-CHAVES, 2013; WANG et al., 2012).

As sequências dos miRNAs maduros avaliados nos ensaios de RT-PCR Taqman encontram-se descritas na tabela abaixo (Tabela 3):

Tabela 3. Sequência dos miRNAs maduros utilizados na quantificação do miRNA-22:

miRNA	Sequência
miRNA-22-3p	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU
miRNA-22-5p	AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUA
U6 snRNA	GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATTGGAACGATACAGAGAAGATTAGC ATGGCCCCTGCGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATATTTT

Figura 5. Descrição esquemática da análise da expressão de miRNAs baseada na técnica de RT-PCR TaqMan, incluindo as etapas de transcrição reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase (PCR) (CHEN et al., 2005).

4.10 Predição *in silico* dos transcritos alvos do miRNA-22

A análise preditiva dos transcritos alvos do miRNA-22 foi realizada através do software miRWalk, o qual apresenta uma plataforma de base de dados comparativos que tem sido extensivamente usada em muitos trabalhos (DWEET; STICHT; GRETZ, 2013). Este software permite a realização de uma análise mais abrangente das possíveis regiões de ligação entre miRNAs e seus potenciais alvos, resultantes da comparação simultânea entre diferentes programas de análises preditivas, como por exemplo, miRWalk, DIANA-mT, miRanda e TargetScan. Além disso, por utilizar diferentes algoritmos de interação entre miRNA-mRNA alvo, o miRWalk também é útil para reduzir a probabilidade de introdução de falsos positivos e/ou negativos nos resultados.

Os quatro programas de análises preditivas utilizados na pesquisa de potenciais mRNAs alvos do miRNA-22, através do software miRWalk, estão descritos abaixo (Tabela 4).

Tabela 4. Principais características dos programas utilizados na análise preditiva:

Programa	Espécies	Algoritmos usados
miRWalk	Humano, Camundongo e Rato	Complementaridade de bases entre miRNA e seu alvo Modelo estatístico
TargetScan	Mamíferos, Moscas, Vermes e Peixes	Complementaridade de bases entre miRNA e seu alvo Estabilidade termodinâmica do complexo miRNA-mRNA Conservação de sítios alvos
miRanda	Humano, Camundongo, Rato, Moscas e Vermes	Complementaridade de bases entre miRNA e seu alvo Estabilidade termodinâmica do complexo miRNA-mRNA Conservação de sítios alvos
Diana-microT	Humano	Complementaridade de bases entre miRNA e seu alvo Estabilidade termodinâmica do complexo miRNA-mRNA

4.11 Forma de análise dos resultados

Os resultados obtidos foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média ou expressos em porcentagem ou vezes de variação em relação ao grupo controle (100% ou 1), sendo o “n” correspondente ao número de animais utilizados para formar cada grupo experimental.

Os dados foram analisados e comparados utilizando-se a Análise de Variância de uma via (one-way ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey para as análises entre grupos (controle e tratado). Ainda, a Análise de Variância de duas vias (two-way ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni foi empregada para comparar múltiplos grupos (animais controle e tratados por 10 e 20 semanas). A diferença estatisticamente significativa foi definida para valores de $P < 0,05$.

A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizados utilizando-se os programas *GraphPad Prism* versão 5 e *Origin* versão 7.

5 RESULTADOS

5.1 Estabelecimento do Modelo Experimental

5.1.1 Análise do consumo de água, de ração e de ingestão calórica

O tratamento dos camundongos com as três diferentes dietas (controle, HF45% e HF60%) foi realizado durante 10 e 20 semanas, sendo o consumo de água e de ração e o ganho de peso corpóreo acompanhados semanalmente.

O efeito destes tratamentos em relação ao consumo de água e de ração é demonstrado a seguir (Figuras 6 e 7).

Figura 6. Efeito da dieta controle e das dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) na ingestão de água (mL) ao longo de 20 semanas de tratamento. Os dados representam a média de ingestão de água por animal por semana, proveniente de 3 diferentes grupos experimentais (n=4-5 animais por grupo).

Como pode ser observado na Figura 6, não houve diferença significativa na ingestão de água entre o grupo controle e os grupos tratados ao longo das 20 semanas de tratamento.

Figura 7. Efeito da dieta controle e das dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) na ingestão de ração (g) ao longo de 20 semanas de tratamento. Os dados representam a média de consumo de ração por animal por semana, provenientes de 3 diferentes grupos experimentais. * HF60% vs controle ($P < 0,05$); HF45% # vs controle ($P < 0,05$); $n=4-5$ animais por grupo.

Conforme demonstrado na Figura 7, o consumo de ração foi menor no grupo tratado com a dieta HF60% em relação ao grupo controle durante todo o tratamento. Já o grupo tratado com a dieta HF45% apresentou um menor consumo de ração a partir da 3ª semana, o qual foi mantido até a 19ª semana de tratamento.

Considerando que as dietas hiperlipídicas apresentam uma maior quantidade de calorias por grama de ração do que a dieta controle (Tabela 1), realizou-se uma estimativa de ingestão calórica baseada no consumo semanal de ração de cada grupo. O efeito das diferentes dietas sobre o consumo calórico semanal por animal na 1ª, 5ª, 10ª, 15ª e 20ª semana de tratamento é demonstrado na Figura 8 a seguir.

Figura 8. Efeito das diferentes dietas sobre a ingestão de calorias (kcal) semanal por animal na 1ª, 5ª, 10ª, 15ª e 20ª semana de tratamento. Os dados representam a média de ingestão calórica semanal por animal (kcal/camundongo/semana), provenientes de 3 diferentes grupos experimentais. * HF60% vs controle ($P<0,05$); # HF45% vs controle ($P<0,05$); $n=4-5$ animais por grupo.

Embora os grupos HF45% e HF60% tenham apresentado um menor consumo de ração, ambos tiveram uma maior ingestão calórica semanal quando comparados ao grupo controle a partir da 1ª semana, sendo este perfil mantido até o final do tratamento. Ainda, é interessante notar que o nível de ingestão calórica foi similar entre os grupos HF45% e HF60% ao longo do tratamento.

5.1.2 Análise do efeito da dieta hiperlipídica sobre o ganho de peso corpóreo semanal

Para avaliar o efeito das diferentes dietas sobre o ganho de peso corpóreo, calculou-se a média de ganho de peso dos camundongos de cada grupo experimental semanalmente. Os dados referentes a esta análise encontram-se abaixo, nas Figuras 9 e 10.

Figura 9. Análise do ganho de peso corpóreo semanal de camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) por 10 semanas. Os dados representam a média de peso corporal semanal dos camundongos, provenientes de 3 diferentes grupos experimentais. * vs controle ($P < 0,05$); # vs HF45% ($P < 0,05$); $n = 10$ animais por grupo.

O grupo submetido à dieta com 60% das calorias provenientes de lipídeos (HF60%) por 10 semanas apresentou um ganho de peso mais acentuado a partir da 4ª semana de tratamento em relação ao grupo controle e ao grupo HF45%, sendo este ganho mantido até a 10ª semana de tratamento, conforme Figura 9 acima. Já o grupo submetido à dieta HF60% por 20 semanas apresentou um ganho de peso mais acentuado a partir da 12ª semana de tratamento em relação ao grupo controle e ao grupo HF45%, o qual se manteve elevado até a 20ª semana de tratamento, conforme Figura 10, a seguir.

Figura 10. Análise do ganho de peso corpóreo semanal de camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) por 20 semanas. Os dados representam a média de peso corporal semanal dos camundongos, provenientes de 3 diferentes grupos experimentais. * vs controle ($P < 0,05$); # vs HF 45% ($P < 0,05$); $n = 10$ animais por grupo.

5.1.3 Avaliação do efeito da dieta hiperlipídica sobre a gordura corpórea abdominal

Os animais tratados com as diferentes dietas por 10 semanas foram submetidos ao imageamento *in vivo*, junto ao CEFAP – USP, para avaliar a área de tecido adiposo abdominal (Figura 11). Infelizmente, a análise do grupo tratado por 20 semanas não foi possível pois o equipamento encontrava-se quebrado ao término dos experimentos com este grupo.

Figura 11. Imagem de raio X representativo (A) e quantificação da área de gordura abdominal (B) de camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) por 10 semanas, normalizada pelo comprimento da tibia. * vs controle ($P < 0,05$); $n = 4$ animais por grupo.

Conforme pode ser observado na Figura 11, os animais tratados com as dietas hiperlipídicas apresentaram uma maior porcentagem de gordura abdominal em relação ao controle, que recebeu uma dieta padrão. Estes resultados corroboram os valores encontrados para a massa de tecido adiposo epididimal dos animais tratados com as dietas HF45% e HF60%, conforme demonstrado na Tabela 5, a seguir.

Tabela 5. Análise da massa de tecido adiposo epididimal em camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) por 10 e 20 semanas, provenientes de 3 diferentes grupos experimentais:

		Tecido Adiposo Epididimal		Tecido Adiposo Epididimal / Compr. Tibia	
		Direito (g)	Esquerdo (g)	Direito (g/mm)	Esquerdo (g/mm)
10 semanas	Controle	0,31 ± 0,09	0,31 ± 0,09	0,018 ± 0,005	0,018 ± 0,005
	HF 45%	0,53 ± 0,08*	0,55 ± 0,08*	0,030 ± 0,004*	0,031 ± 0,005*
	HF 60%	0,66 ± 0,16*#	0,72 ± 0,21*#	0,037 ± 0,009*	0,040 ± 0,012*#
20 semanas	Controle	0,44 ± 0,14	0,43 ± 0,17	0,024 ± 0,008	0,024 ± 0,010
	HF 45%	0,78 ± 0,17*	0,80 ± 0,23*	0,044 ± 0,010*	0,045 ± 0,013*
	HF 60%	1,19 ± 0,25*#	1,22 ± 0,26*#	0,068 ± 0,014*#	0,069 ± 0,015*#

* vs controle (P<0,05); # vs HF 45% (P<0,05); n=9-10 animais por grupo

A análise dos resultados da Tabelas 5 demonstram que a massa de tecido adiposo epididimal foi significativamente aumentada nos grupos submetidos às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) por 10 e 20 semanas em relação ao respectivo grupo controle, indicando que as dietas hiperlipídicas aumentaram a adiposidade corpórea. Outros parâmetros, como massa do fígado e dos pulmões, não foram alterados significativamente pelas dietas hiperlipídicas, conforme demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6. Análise da massa do fígado e dos pulmões em camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) por 10 e 20 semanas (n=9-10 animais por grupo):

Parâmetro	10 semanas			20 semanas		
	Controle	HF45%	HF60%	Controle	HF45%	HF60%
Fígado (g)	1,273 ± 0,143	1,071 ± 0,168	1,174 ± 0,152	1,144 ± 0,108	1,033 ± 0,072	1,223 ± 0,157
Fígado / Comp. Tibia(g/mm)	0,072 ± 0,008	0,060 ± 0,009	0,065 ± 0,008	0,063 ± 0,005	0,058 ± 0,003	0,070 ± 0,008
Pulmões (g)	0,135 ± 0,030	0,127 ± 0,027	0,137 ± 0,035	0,091 ± 0,020	0,086 ± 0,018	0,095 ± 0,021
Pulmões / Comp. Tibia (g/mm)	0,008 ± 0,002	0,007 ± 0,002	0,008 ± 0,002	0,005 ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,005 ± 0,001

5.1.4 Análise da glicemia, colesterol, triglicérides, insulina, leptina e adiponectina no soro

De acordo com a Figura 12 abaixo, os níveis de triglicérides e de colesterol total foram aumentados no grupo tratado com a dieta HF60% por 10 e 20 semanas. Já o grupo tratado com a dieta

HF45% apresentou um aumento nos níveis séricos de colesterol total e triglicérides apenas no grupo tratado por 20 semanas.

Figura 12. Análise dos níveis de triglicérides e colesterol total em camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) por 10 (A, C) e 20 semanas (B, D). * vs controle ($P < 0,05$); # vs HF45% ($P < 0,05$); $n = 5$ animais por grupo.

Em relação à glicose e insulina, ambos os níveis foram aumentados no grupo HF60% em comparação ao grupo controle, após 10 e 20 semanas de tratamento (Figura 13).

Figura 13. Análise da glicemia e dos níveis de insulina em camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) por 10 (A, C) e 20 semanas (B, D). * vs controle ($P < 0,05$); # vs HF45% ($P < 0,05$); $n = 5$ animais por grupo.

Os níveis de leptina foram aumentados no grupo HF60% em comparação ao grupo controle, após 10 e 20 semanas de tratamento. Já o grupo HF45% apresentou um aumento nos níveis de leptina apenas nos animais tratados por 20 semanas. Os níveis de adiponectina não foram alterados significativamente em nenhum dos grupos, conforme pode ser observado abaixo, na Figura 14.

Figura 14. Análise dos níveis de leptina e adiponectina em camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) por 10 (A, C) e 20 semanas (B, D). * vs controle ($P < 0,05$); # vs HF45% ($P < 0,05$); $n = 5$ animais por grupo.

Para avaliar se o tratamento com as dietas hiperlipídicas foi capaz de alterar o controle glicêmico, os camundongos foram submetidos ao teste de tolerância à glicose intraperitoneal (iGTT), conforme demonstrado na Figura 15.

O ensaio de iGTT demonstrou que os grupos submetidos à dieta HF60% apresentaram uma glicemia aumentada em relação ao grupo controle em diversos tempos avaliados. Ainda, o cálculo da área sob a curva mostrou-se aumentado nos grupos submetidos à dieta HF60% por 10 e 20 semanas, sugerindo que a dieta rica em gordura HF60% promoveu um prejuízo na manutenção da homeostase glicêmica desses animais. Entretanto, o grupo HF45% não apresentou uma alteração no controle da homeostasia glicêmica quando comparado ao grupo controle.

Figura 15. Ensaio de tolerância à glicose intraperitoneal (iGTT) e cálculo da área sob a curva em camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) após 10 (A, C) e 20 (B, D) semanas de tratamento. Após 12 horas de jejum, os animais foram submetidos à análise de glicemia de jejum (tempo 0), e posteriormente, receberam uma injeção intraperitoneal de glicose (2g/kg de animal), e a glicemia foi mensurada após 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min.*vs controle ($P<0,05$); # vs HF45% ($P<0,05$); $n=5$ animais por grupo.

O modelo homeostático de resistência insulínica (HOMA-IR) é um método indireto de avaliação da sensibilidade à insulina. Seu valor foi calculado para os grupos tratados por 10 e 20 semanas e os dados resultantes desta análise são demonstrados a seguir, na Figura 16.

Figura 16. Cálculo do índice HOMA-IR em camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) após 10 e 20 semanas. * vs controle ($P < 0,05$); $n = 5-7$ animais por grupo.

O índice de HOMA-IR foi aumentado nos grupos HF60% após 10 e 20 semanas de tratamento em relação aos respectivos controles, sugerindo que a dieta contendo 60% das calorias provenientes de lipídeos induziu resistência à insulina.

5.1.5 Análise do efeito da dieta hiperlipídica sobre a massa e morfologia cardíaca

O efeito da dieta hiperlipídica sobre a modulação da massa cardíaca foi inicialmente avaliada através da massa do coração, bem como pela razão entre a massa do coração e o comprimento da tibia, após 10 e 20 semanas de tratamento. Ainda, foi realizada a análise da expressão gênica dos seguintes marcadores de hipertrofia cardíaca: BNP, α -MHC, β -MHC e α -actina esquelética, conforme demonstrado na Figura 17, a seguir.

Figura 17. Análise da hipertrofia cardíaca induzida pela dieta rica em gordura (HF45% e HF60%), por 10 e 20 semanas de tratamento. A- massa cardíaca e razão massa cardíaca/comprimento da tibia; B- marcadores de hipertrofia, normalizados pelo GAPDH.* vs controle ($P < 0,05$); # vs HF45% ($P < 0,05$); $n=4-7$ animais por grupo.

Os resultados mostram que a massa do coração e a razão da massa do coração pelo comprimento da tibia foram significativamente aumentados no grupo HF60% após 10 e 20 semanas de tratamento em relação ao grupo controle, indicando o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca. No

entanto, o grupo HF45% não apresentou alteração significativa na massa do coração, bem como na razão massa do coração/comprimento da tibia em relação ao grupo controle (Figura 17-A).

A expressão gênica da α -actina esquelética foi significativamente aumentada no grupo HF60% e a expressão gênica de BNP foi significativamente aumentada no grupo HF45%, após 10 semanas. No entanto, não se observou alteração significativa na expressão gênica de nenhum dos marcadores após 20 semanas de tratamento com as dietas hiperlipídicas. De forma similar, os níveis de expressão gênica da α -MHC e β -MHC não foram alterados pelas dietas hiperlipídicas após 10 e 20 semanas de tratamento, como pode ser evidenciado na Figura 17-B.

No intuito de caracterizar o remodelamento cardíaco desencadeado pela dieta hiperlipídica, avaliou-se também o diâmetro transversal dos cardiomiócitos (Figura 18), bem como a deposição de colágeno (Figura 19) nos corações dos diferentes grupos experimentais (imagens representativas nos apêndices A e B, respectivamente).

Figura 18. Análise do diâmetro transversal de cardiomiócitos de camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) por 10 (A) e por 20 semanas (B). * vs controle ($P < 0,01$); # vs HF45% ($P < 0,01$); $n = 50$ fibras de 3 diferentes animais de cada grupo.

Conforme pode ser observado na Figura 18, as análises histológicas evidenciaram que os grupos HF45% e HF60% apresentaram um aumento significativo no diâmetro transversal dos cardiomiócitos em relação ao grupo controle, após 10 e 20 semanas de tratamento.

Em relação ao conteúdo de colágeno, os resultados obtidos demonstram que tanto o grupo HF45% quanto o HF60% apresentaram um aumento da área de colágeno no tecido cardíaco após 10 e 20 semanas de tratamento, em relação ao grupo controle (Figura 19).

Figura 19. Análise da quantificação de colágeno no coração de camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%), por 10 (A) e por 20 semanas (B), avaliada por Tricoma de Masson. * vs controle ($P < 0,01$); $n=3$ animais por grupo.

Para avaliar se o ganho de peso corpóreo poderia estar relacionado ao aumento da massa cardíaca, plotou-se um gráfico de dispersão com as duas variáveis de interesse e calculou-se o coeficiente de correlação linear de Pearson, o qual está demonstrado na Figura 20, a seguir:

Figura 20. Análise da correlação linear de Pearson entre a massa cardíaca normalizada pelo comprimento da tíbia (mg/mm) e o peso corpóreo de camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%), por 10 semanas (A) ($n=20$ animais por grupo; $P < 0,001$; $r = 0,68$) e por 20 semanas (B) ($n=29$ animais por grupo; $P < 0,001$; $r = 0,79$).

A análise dos gráficos mostrou uma correlação positiva moderada entre a massa cardíaca e o peso corpóreo no grupo tratado por 10 semanas com as diferentes dietas ($r = 0,68$). Já o grupo tratado por 20 semanas apresentou uma correlação positiva forte ($r = 0,79$) entre a massa cardíaca e o peso corpóreo.

Em relação à função cardíaca, conforme pode ser observado na Figura 21, a administração das dietas HF45% e HF60% não alterou significativamente os diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (LVEDD e LVESD, respectivamente) em relação ao grupo controle. A espessura relativa da parede ventricular (LV-RWT) e a fração de encurtamento (FS) também não foram alteradas nos grupos submetidos às dietas hiperlipídicas. Logo, através da técnica de ecocardiografia não foi possível observar comprometimento da função cardíaca nos animais submetidos às dietas HF45% e HF60% por 10 e 20 semanas.

Figura 21. Parâmetros ecocardiográficos de camundongos alimentados com dieta controle ou com dietas ricas em gordura (HF45% e HF60%), após 10 e 20 semanas de tratamento. (A) e (B): diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (LVEDD); (C) e (D): diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (LVESD); (E) e (F): espessura relativa da parede (LV-RWT); (G) e (H): fração de encurtamento (FS). (n=4–5 animais por grupo).

O ensaio de isquemia e reperfusão (I/R), através da técnica de Langendorff (*ex-vivo*), foi empregada para complementar a avaliação da função cardíaca dos animais submetidos às dietas rica em gordura.

A pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP) corresponde à diferença entre o pico de pressão sistólica e a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, sendo que este é um parâmetro de fundamental importância para avaliar a função cardíaca.

Conforme observado na Figura 22-A, não houve diferença no valor de LVDP entre os grupos analisados no período de estabilização, momento anterior ao insulto isquêmico. Entretanto, durante o período de reperfusão (após o insulto isquêmico), houve uma redução significativa da LVDP no grupo HF60% em relação ao grupo controle, sugerindo um prejuízo na função sistólica do ventrículo esquerdo desses animais (Figura 22-B).

Figura 22. Efeito da dieta controle ou das dietas ricas em gordura (HF45% e HF60%) por 10 semanas sobre a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP), em modelo de I/R. LVDP, em mmHg, no período de estabilização (A) e LVDP apresentada como % em relação ao controle (período de estabilização), após 45 minutos de reperfusão (B). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização; * vs controle ($P < 0,05$); $n=5$ animais por grupo.

Outro parâmetro bastante utilizado para avaliação da função do ventrículo esquerdo é a variação da pressão por unidade de tempo (dP/dt), também chamada 1ª derivada temporal da pressão ventricular. A derivada positiva ou $dP/dt_{\text{máxima}}$ ($+dP/dt$) é considerada um índice de contratilidade e através deste parâmetro pode-se avaliar indiretamente o inotropismo cardíaco, que corresponde de forma geral, à força de contração muscular do coração.

No período de estabilização, a $dP/dt_{\text{máxima}}$ não foi alterada em nenhum dos grupos (Figura 23-A). Da mesma forma, durante o período de reperfusão, também não houve diferença entre os grupos, sugerindo que nos grupos tratados com as dietas hiperlipídicas não houve um prejuízo na capacidade de contração cardíaca (Figura 23-B). Entretanto, é válido ressaltar que houve uma tendência de redução no grupo HF60% em relação ao controle, o que pode ser comprovado pelo valor de P

(0,0529). Neste sentido, futuramente será necessário a realização de um novo grupo para confirmar este dado.

Figura 23. Efeito da dieta controle ou das dietas ricas em gordura (HF45% e HF60%) por 10 semanas sobre a contração muscular cardíaca em modelo de I/R. Primeira derivada positiva de pressão por tempo (+dP/dt), em mmHg (A) e em % em relação ao controle (período de estabilização) após 45 minutos de reperusão (B). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização; n=5 animais por grupo.

A derivada negativa ou $dP/dt_{\text{mínima}}$ (-dP/dt) permite avaliar indiretamente a capacidade de relaxamento cardíaco global, também chamado de lusitropismo cardíaco. Em relação à $dP/dt_{\text{mínima}}$, também não houve alteração significativa entre os grupos. No entanto, observou-se uma considerável tendência de redução deste parâmetro no grupo tratado com a dieta HF60% em relação ao grupo controle (Figura 24-A). Estes animais parecem partir de basais diferentes, sugerindo um prejuízo inicial na capacidade de relaxamento cardíaco. Já durante a reperusão, este comprometimento da capacidade de relaxamento foi evidenciado através da redução significativa da $dP/dt_{\text{mínima}}$ no grupo HF60% em relação ao controle (Figura 24-B).

Figura 24. Efeito da dieta controle ou das dietas ricas em gordura (HF45% e HF60%) por 10 semanas sobre a capacidade de relaxamento cardíaco em modelo de I/R. Primeira derivada negativa de pressão por tempo (-dP/dt), em mmHg (A) e em% em relação ao controle (período de estabilização) após 45 minutos de reperusão (B). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização. * vs controle ($P < 0,05$); $n=5$ animais por grupo.

Avaliou-se também a extensão do infarto cardíaco no coração dos animais tratados com ambas as dietas ricas em gordura, através do estudo anatomopatológico por coloração com cloreto de trifêniltetrazólio (TTC). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 25, a seguir.

Figura 25. Efeito da dieta controle ou das dietas ricas em gordura (HF45% e HF60%) por 10 semanas sobre a área de infarto, mostrada como % em relação à área total cardíaca nos diferentes grupos experimentais (A) e cortes transversais de corações corados com TTC (B). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da porcentagem de alteração da área infartada. * vs controle ($P < 0,05$); $n = 5$ animais por grupo.

Como pode ser observado na Figura 25, houve um aumento da área infartada nos corações dos animais tratados com as dietas hiperlipídicas em relação aos animais controle (5,8%), sendo esta área de 22,1% para o grupo HF45% e 31,5% para o grupo HF60%.

5.2 Efeito da dieta hiperlipídica sobre o padrão de expressão de miRNAs por sequenciamento

Com o objetivo de avaliar se o padrão de expressão de miRNAs no coração é alterado em resposta à dieta rica em gordura, inicialmente foi realizado o sequenciamento de miRNAs dos corações dos camundongos alimentados com as dietas ricas em gordura (HF45% e HF60%) e com a dieta controle, após 10 e 20 semanas de tratamento.

As dietas hiperlipídicas em relação à dieta controle foram capazes de alterar a expressão de um considerável número de miRNAs, conforme dados do sequenciamento contidos na Tabela 7, a seguir.

Tabela 7. Alteração na abundância de miRNAs no coração de camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) por 10 e 20 semanas (n=3 animais por grupo):

Número de miRNAs alterados	10 SEMANAS		20 SEMANAS	
	HF45%	HF60%	HF45%	HF60%
	64	27	26	88

O heatmap dos miRNAs cardíacos diferencialmente expressos está apresentado na Figura 26, a seguir.

Figura 26. Heatmap dos miRNAs diferencialmente expressos no coração de camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%), por 10 semanas (A-B) e 20 semanas (C-D), avaliados por sequenciamento de miRNA. A intensidade da cor verde representa expressão gênica reduzida e a intensidade da cor vermelha representa expressão gênica aumentada (n=3 por grupo).

O nível de expressão do miRNA-22-3p mostrou-se diminuído no grupo HF45% tratado por 10 semanas em relação ao controle e o nível de expressão do miRNA-22-5p apresentou-se aumentado no grupo HF60% tratado por 10 semanas em relação ao controle (Figura 26-A e 26-B, respectivamente).

Indicado pelas setas vermelhas). No entanto, não foi encontrada alteração na expressão do miRNA-22-3p e 5p nos grupos HF45% e HF60% após 20 semanas de tratamento.

Além do miRNA-22, diversos outros miRNAs também foram alterados no modelo em estudo (GUEDES et al., 2015). Os miRNAs cujos níveis de expressão foram mais aumentados no coração dos animais tratados com a dieta HF45% por 10 semanas foram: miRNA-675-3p, miRNA-34b-3p, miRNA-21a-5p, miRNA-195a-3p, miRNA-1198-5p, miRNA-134-5p, miRNA-338-5p, miRNA-99b-5p, miRNA-130b-5p e let-7b-3p. Já entre os miRNAs cujos níveis de expressão foram mais diminuídos neste mesmo grupo, destacam-se: miRNA-15a-3p, let-7i-3p, miRNA-125a-3p, miRNA-7225-5p, miRNA-20a-3p, miRNA-7225-3p, miRNA-677-5p, miRNA-504-3p, miRNA-499-5p e miRNA-3069-3p.

Da mesma forma, os miRNAs cujos níveis de expressão foram mais aumentados no coração dos animais tratados com a dieta HF60% por 10 semanas foram: miRNA-671-5p, miRNA-139-5p, miRNA-328-3p, miRNA-223-3p, let-7a-5p, miRNA-126a-5p, miRNA-26b-5p e miRNA-22-5p. Já os mais diminuídos neste mesmo grupo foram: miRNA-29b-3p, miRNA-500-3p, miRNA-29c-3p, miRNA-199a-5p, let-7i-3p, miRNA-499-5p, miRNA-193a-3p, miRNA-144-3p, miRNA-15a-3p e miRNA-7225-3p.

Adicionalmente, observou-se que, miRNA-141-5p, miRNA-141-3p, miRNA-144-3p, miRNA-122-5p, miRNA-130b-5p, miRNA-497-3p, miRNA-33-5p, miRNA-136-5p, miRNA-214-5p e miRNA-21a-3p foram os mais aumentados no grupo tratado com a dieta HF45% por 20 semanas. Ao contrário, miRNA-99a-5p, miRNA-342-3p, miRNA-532-3p, miRNA-10b-5p, miRNA-3102-3p, miRNA-129-2-3p, miRNA-147-3p e miRNA-1198-3p foram os miRNAs com níveis de expressão mais diminuídos neste mesmo grupo.

Por fim, encontrou-se também que, miRNA-141-5p, miRNA-5621-5p, miRNA-5621-3p, miRNA-144-3p, miRNA-141-3p, miRNA-214-5p, miRNA-130b-5p, miRNA-450a-5p, miRNA-195a-3p e miRNA-497-3p foram os miRNAs com níveis de expressão mais aumentados no grupo HF60% por 20 semanas. Ainda, identificou-se que, miRNA-7a-5p, miRNA-543-3p, miRNA-494-3p, miRNA-182-5p, miRNA-677-5p, miRNA-211-5p, miRNA-218-2-3p, miRNA-137-3p, miRNA-7b-5p e miRNA-344-3p foram os miRNAs mais diminuídos HF60% tratado por 20 semanas.

5.2.1 Análise da expressão do miRNA-22 por RT-PCR TaqMan

Para validar os resultados obtidos no sequenciamento, avaliou-se a expressão do miRNA-22 no tecido cardíaco dos diferentes grupos através da técnica de RT-PCR Taqman.

Corroborando os resultados encontrados no Sequenciamento (Figura 26), evidenciou-se um aumento significativo na expressão do miRNA-22-5p no coração dos camundongos alimentados com a dieta rica em gordura (HF60%) por 10 semanas (Figura 27-A). Já os animais submetidos às dietas

hiperlipídicas (HF45% e HF60%) por 20 semanas não apresentaram alteração nos níveis do miRNA-22-5p em relação aos animais controle (Figura 27-B).

Figura 27. Análise da expressão do miRNA-22-5p por RT-PCR TaqMan no coração de camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) por 10 semanas (A) e por 20 semanas (B). * vs controle ($P < 0,05$); $n=4-5$ animais por grupo.

Em relação ao miRNA-22-3p, embora no resultado do sequenciamento os animais submetidos à dieta HF45% por 10 semanas tenham apresentado uma redução na sua expressão em relação ao controle, na validação por RT-PCR Taqman este efeito não foi observado. Os resultados obtidos mostraram que apenas os animais alimentados com a dieta rica em gordura (HF60%) por 10 semanas apresentaram um aumento significativo na expressão do miRNA-22-3p (Figura 28-A). Já os animais submetidos às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) por 20 semanas não apresentaram alteração nos níveis do miRNA-22-3p em relação aos animais controle (Figura 28-B).

Figura 28. Análise da expressão do miRNA-22-3p por RT-PCR TaqMan no coração de camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) por 10 semanas (A) e por 20 semanas (B). * vs controle ($P < 0,05$); # vs HF45% ($P < 0,05$); $n=3-5$ animais por grupo.

Para avaliar se os aumentados níveis do miRNA-22 poderiam estar relacionados ao aumento da massa cardíaca evidenciada no grupo HF60%, plotou-se um gráfico de correlação entre a razão da massa cardíaca normalizada pelo comprimento da tibia e a expressão do miRNA-22 e calculou-se o coeficiente de correlação linear de Pearson, o qual está demonstrado na Figura 29, a seguir.

Figura 29. Análise da correlação linear de Pearson entre a massa cardíaca normalizada pelo comprimento da tibia (mg/mm) e os níveis do miRNA-22 em camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) por 10 semanas (n=11; $P<0,001$; $r = 0,91$).

A análise do gráfico mostrou uma correlação positiva forte ($r = 0,91$) entre a massa cardíaca e o nível de expressão do miRNA-22 no grupo tratado com a dieta HF60% por 10 semanas.

5.3 Predição *in silico* dos transcritos alvos do miRNA-22

Com o intuito de identificar os potenciais mRNAs alvos do miRNA-22, realizou-se a análise preditiva através do software miRWalk, comparando-se os resultados de quatro bancos de dados diferentes (miRwalk, Diana, miRanda e TargetScan). Como resultado desta busca foram encontrados 874 potenciais transcritos alvos do miRNA-22 em comum aos quatro bancos de dados (Figura 30).

Figura 30. Esquema representativo do resultado da análise preditiva *in silico*, usando o software miRWalk.

Dois destes potenciais transcritos alvos do miRNA-22 foram selecionados para avaliação da sua expressão gênica e protéica. A seleção foi feita com base no resultado da análise preditiva e levando em consideração alvos que já foram implicados no desenvolvimento de outros modelos de hipertrofia cardíaca.

Como pode ser observado na Tabela 8 abaixo, os mRNAs da caveolina-1 e da caveolina-3 apareceram como potenciais alvos do miRNA-22 nos quatro bancos de dados comparados. De fato, um estudo anterior demonstrou que a caveolina-3 corresponde a um transcrito alvo do miRNA-22 (GURHA et al., 2012). No entanto, até o momento não há estudos que tenham comprovado que a caveolina-1 é um alvo do miRNA-22.

As caveolinas são proteínas da membrana plasmática, essenciais para a formação das cavéolas. Existem três homólogos da caveolina: caveolina-1, caveolina-2 e caveolina-3, com pesos moleculares médios que variam de 20 a 24 kDa. A caveolina-3 é primariamente responsável pela formação da cavéola do músculo estriado, ao passo que a caveolina-1 contribui para a formação da cavéola em outros locais, como músculo liso e células endoteliais (RAHMAN; SWARD, 2009). Alguns estudos têm mostrado que as caveolinas exercem múltiplas funções no sistema cardiovascular (LI; EVERSON; SMART, 2005) e estão envolvidas em processos patológicos que acometem o coração (FRANK et al., 2007; MURFITT et al., 2015). Por esta razão, selecionamos ambas as proteínas para avaliação de sua expressão gênica e proteica no coração dos animais alimentados com as diferentes dietas.

Tabela 8. Dois potenciais alvos do miRNA-22, provenientes da análise preditiva *in silico* usando software MiRWalk:

miRNA	mRNA	DIANAmT	miRanda	miRWalk	TargetScan	SOMA
miRNA-22	Cav1	1	1	1	1	4
	Cav3	1	1	1	1	4

5.4 Análise da expressão gênica por Real Time RT-PCR

De acordo com a Figura 31 a seguir, não foram observadas alterações significativas na expressão gênica de caveolina-1 e caveolina-3 no coração dos animais tratados com as dietas ricas em gordura.

Figura 31. Análise dos níveis de mRNA de caveolina-1 e caveolina-3 por RT-PCR no coração de camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%), após 10 (A, C) e 20 semanas (B, D); (n=4-5 animais por grupo).

5.5 Análise da expressão protéica por Western Blotting

Considerando que alguns miRNAs exercem seus efeitos através da repressão da tradução de transcritos alvos, independente do seu efeito na indução da degradação do mRNA, avaliamos também os níveis protéicos das caveolinas 1 e 3 no coração dos animais tratados com as diferentes dietas. Os resultados encontrados são apresentados na Figura 32, a seguir.

Figura 32. Análise dos níveis de caveolina-1 e caveolina-3 avaliados por Western Blotting no coração de camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%), após 10 (A, C) e 20 semanas (B, D). * vs controle ($P < 0,05$); # vs HF45% ($P < 0,05$), $n = 4-5$ animais por grupo.

Os níveis protéicos da caveolina-3 nos animais tratados com as dietas hiperlipídicas não foram alterados em nenhum dos tempos de tratamento (Figura 32-C e D). Já os níveis protéicos da caveolina-1 não sofreram alterações após 10 semanas de tratamento, mas foram significativamente aumentados nos animais alimentados com a dieta HF60% após 20 semanas (Figura 32-B).

6 DISCUSSÃO

A administração das dietas hiperlipídicas promoveu um aumento da ingestão calórica e, em consequência, da adiposidade corpórea, o que foi evidenciado pela análise da massa do tecido adiposo epididimal e da porcentagem de gordura abdominal.

Um ganho significativo de massa corpórea foi observado nos animais tratados com a dieta HF60% por 10 e 20 semanas, corroborando o que já foi demonstrado em trabalhos anteriores (CEYLAN-ISIK et al., 2013; CINTRA et al., 2012; GRUETER et al., 2012).

Apesar de algumas pesquisas já terem mostrado que a dieta HF45% induz um aumento significativo no ganho de peso corpóreo dos animais (CARRER et al., 2012; HUA et al., 2013; TURDI et al., 2011; NOYAN-ASHRAF et al., 2013), isto não foi observado nos nossos grupos experimentais, de forma similar a outros grupos de pesquisa que também demonstraram que esta dieta não é capaz de promover o ganho de peso dos animais ao longo de 20 semanas de tratamento (HUANG et al., 2008; LITTLEJOHNS et al., 2014). As razões para as diferenças observadas no ganho de peso frente à dieta hiperlipídica ainda não estão totalmente esclarecidas, mas sabe-se que fatores como, palatabilidade da ração, número de animais por gaiola e idade de início do tratamento, certamente podem contribuir para as variações fenotípicas observadas entre os diferentes modelos de obesidade.

A dieta HF60% administrada por 10 e 20 semanas foi capaz de induzir um aumento nos níveis séricos de triglicérides e colesterol total, bem como dos níveis de glicemia, insulinemia e leptina. Além disso, os grupos submetidos a esta dieta apresentaram uma glicemia aumentada em relação ao grupo controle, sugerindo que a dieta HF60% promoveu um prejuízo na manutenção da homeostase glicêmica e induziu resistência à insulina, conforme os valores calculados para HOMA-IR. Estes resultados estão em concordância com outros trabalhos da literatura que utilizaram modelos de obesidade similares ao nosso, os quais também demonstraram que as dietas hiperlipídicas induzem um prejuízo na homeostase glicêmica, resistência à insulina e aumento de triglicérides e colesterol séricos (CARRER et al., 2012; CEYLAN-ISIK et al., 2013; GRUETER et al., 2012; MARCOTORCHINO et al., 2014; POUDYAL et al., 2012; TURDI et al., 2011).

O aumento da concentração de leptina no plasma é positivamente correlacionado com o índice de massa corpórea e o nível de adiposidade, uma vez que o tecido adiposo é a principal fonte de produção desta adipocitocina (KARMAZYN; GAN; RAJAPUROHITAM, 2013). A leptina, além de atuar como um sinal regulador da saciedade, também exerce diversos efeitos sobre o sistema cardiovascular. Há evidências de que o aumento da leptina induzido pela obesidade está diretamente associado ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, bem como ao aumento do risco de falência cardíaca observado em obesos (KARMAZYN; GAN; RAJAPUROHITAM, 2013). Além disso, há estudos

demonstrando que a leptina é capaz de promover diretamente a hipertrofia dos cardiomiócitos (KARMAZYN; RAJAPUROHITAM, 2014; RAJAPUROHITAM et al., 2003) e de aumentar a deposição de colágeno no coração (MADANI et al. 2006; SCHRAM et al. 2008; SWEENEY, 2010; ZIBADI et al., 2011), contribuindo para o remodelamento cardíaco. Considerando que as dietas hiperlipídicas aumentaram os níveis de leptina, é possível que ao menos parte das alterações morfológicas e funcionais cardíacas desencadeadas pelas dietas ricas em gordura sejam mediadas pelos aumentados níveis desta adipocitocina.

De forma contrária à leptina, os níveis de adiponectina são normalmente menores em indivíduos obesos (ARITA et al., 1999; KARMAZYN; GAN; RAJAPUROHITAM, 2013) e há estudos sugerindo que os níveis aumentados desta adipocitocina no plasma estão associados à um menor risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, indicando que a adiponectina pode desempenhar um importante papel cardioprotetor (KARMAZYN; GAN; RAJAPUROHITAM, 2013; KAWANO; ARORA, 2009; KOJIMA et al., 2003; NAKAMURA et al., 2004). No entanto, no nosso estudo, as dietas hiperlipídicas não foram capazes de alterar significativamente os níveis de adiponectina no soro dos animais.

Gráficos de dispersão evidenciaram que a hipertrofia cardíaca apresentada pelo grupo HF60% está correlacionada com o aumento de massa corpórea, o que talvez possa explicar porque não se observou um aumento da razão da massa cardíaca/comprimento da tíbia nos grupos tratados com a dieta HF45%, uma vez que estes grupos não apresentaram um aumento significativo da massa corpórea. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que a maioria dos trabalhos que demonstraram um aumento no ganho de peso corpóreo induzido pela dieta HF45%, também apresentam paralelamente um aumento da massa cardíaca e da razão massa cardíaca/comprimento da tíbia (HUA et al., 2013; NOYAN-ASHRAF et al., 2013; TURDI et al., 2011).

Para complementar os resultados obtidos, utilizou-se a análise da expressão de alguns genes que são classicamente utilizados como biomarcadores de hipertrofia cardíaca (COX; MARSH, 2014). Foram avaliados: o BNP, α -MHC e β -MHC e a α -actina esquelética. Os nossos resultados demonstraram um aumento na expressão de BNP e α -actina esquelética nos grupos HF45% e HF60%, respectivamente, após 10 semanas de tratamento. No entanto, a expressão gênica destes marcadores de hipertrofia cardíaca não foi alterada nos grupos tratados com as dietas hiperlipídicas por 20 semanas. O motivo pelo qual a expressão gênica da α -actina esquelética e do BNP não se manteve elevada após 20 semanas de tratamento com a dieta HF60% é desconhecido. Mas é possível que mecanismos de feedback tenham contribuído para reestabelecer os níveis de expressão gênica desses transcritos a níveis similares aos evidenciados no grupo controle.

Ainda que este modelo não tenha apresentado o perfil de reexpressão de genes fetais comuns à outros modelos de hipertrofia cardíaca, esta foi claramente evidenciada através do aumento da razão da massa do coração normalizada pelo comprimento da tíbia. Além disso, as dietas hiperlipídicas também promoveram remodelamento cardíaco, demonstrado pelo aumento do diâmetro transversal dos cardiomiócitos e pela deposição de colágeno no coração, o que já foi observado em trabalhos que utilizaram modelos similares ao deste estudo (ABDURRACHIM et al., 2014; CALLIGARIS et al., 2013; HAFSTAD et al., 2013; QIN et al., 2012; TIKELLIS et al., 2008).

A hipertrofia cardíaca induzida pela dieta hiperlipídica pode ser acompanhada de um comprometimento da função cardíaca, a qual é evidenciada, por exemplo, através do aumento da espessura da parede do ventrículo esquerdo e / ou da diminuição da fração de encurtamento (CEYLAN-ISIK et al., 2013; HUA et al., 2013). Entretanto, ainda há controvérsias sobre o tipo de hipertrofia cardíaca que pode ser desencadeada pelo excesso de gordura corpórea. Um estudo com obesos mostrou alterações na estrutura do ventrículo esquerdo, possivelmente como resultado de um aumento na carga hemodinâmica e de mudanças metabólicas, que ocorrem em conjunto com o acúmulo de gordura corpórea. Conforme o peso corpóreo aumenta, o volume total de sangue e o débito cardíaco também aumentam, causando sobrecarga de volume, o que pode levar ao desenvolvimento de hipertrofia ventricular do tipo excêntrica (DE PERGOLA et al., 2013; MESSERLI, 1982). Porém, existem outros trabalhos mais recentes que contradizem a teoria de que a obesidade *per se* possa desencadear hipertrofia ventricular do tipo excêntrica. Segundo estes estudos, indivíduos obesos apresentam um aumento da espessura da parede do ventrículo esquerdo em relação ao tamanho da cavidade, o que é consistente com uma hipertrofia do tipo concêntrica (DE PERGOLA et al., 2013; KARDASSIS et al., 2012; TURKBAY et al., 2010). No entanto, os resultados das análises ecocardiográficas realizadas no presente estudo não permitiram a caracterização do tipo de hipertrofia cardíaca induzida pela dieta rica em gordura (excêntrica ou concêntrica).

Ainda que muitos trabalhos da literatura demonstrem que tanto a dieta HF45% como a dieta HF60% são capazes de induzir hipertrofia e levar a um comprometimento da função cardíaca (CEYLAN-ISIK et al., 2013; CHESS et al., 2008; HUA et al., 2013; TURDI et al., 2011; ZENG et al., 2015), no presente trabalho não foi evidenciada nenhuma alteração significativa nos principais parâmetros ecocardiográficos nos animais tratados com estas dietas. Não está clara a razão pela qual estas alterações não foram observadas nos grupos submetidos às dietas ricas em gordura. Por isso, novas análises ecocardiográficas serão realizadas em futuros trabalhos, com o intuito de confirmar os resultados obtidos.

Todavia, é importante ressaltar que quando os camundongos tratados com ambas as dietas hiperlipídicas por 10 semanas foram submetidos ao ensaio de I/R, os resultados mostraram um

prejuízo da recuperação miocárdica, a qual é mais acentuada no grupo submetido à dieta HF60%. Este grupo apresentou um comprometimento do relaxamento diastólico e um prejuízo na função sistólica em relação aos animais tratados com a dieta controle. Além disso, os grupos tratados com ambas as dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) apresentaram também uma área cardíaca infartada significativamente maior, o que talvez possa ser atribuído à um maior acúmulo de placas de gordura (aterosclerose) no interior das artérias coronárias, dificultando assim, a passagem sanguínea. Estes dados sugerem que a dieta hiperlipídica HF60% é capaz de comprometer a função miocárdica quando o coração é submetido a I/R.

O resultado do sequenciamento de RNAs dos corações dos camundongos alimentados com as dietas ricas em gordura (HF45% e HF60%) demonstrou que o padrão de expressão de vários miRNAs é alterado em resposta a este tipo de dieta. Um dos miRNAs mais alterados pela dieta hiperlipídica é o miRNA-22 (sequências 3p e 5p), cuja expressão mostrou-se aumentada no grupo HF60% tratado por 10 semanas em relação ao controle. Interessantemente, não foi encontrada alteração na expressão deste miRNA nos grupos tratados por 20 semanas, o que foi confirmado através das análises por RT-PCR Taqman. De forma similar, outros grupos de pesquisa também já demonstraram que quando o coração é submetido a um estímulo de estresse e sofre remodelamento, a expressão do miRNA-22 é levemente elevada durante o estágio inicial da hipertrofia e então gradualmente retorna aos níveis normais, mesmo quando o estímulo de estresse é prolongado (HUANG et al., 2013).

É válido ressaltar que o aumento da expressão do miRNA-22 observado no grupo HF60% tratado por 10 semanas foi acompanhado de um aumento na expressão de α -actina esquelética. Esta possível relação entre a expressão da α -actina esquelética e a expressão do miRNA-22 foi demonstrada pelos resultados do trabalho de Huang et al. (2013), o qual demonstrou que, em culturas de cardiomiócitos, a expressão da α -actina esquelética foi aumentada pelo uso de um mimetizador do miRNA-22, ao passo que a expressão da β -MHC não foi alterada nas mesmas condições. Além disso, este estudo mostrou também que a inibição do miRNA-22 foi capaz de atenuar o aumento da expressão dos marcadores de hipertrofia cardíaca induzida por fenilefrina, sugerindo que o miRNA-22 possui um importante papel na regulação da hipertrofia cardíaca.

Considerando que o miRNA-22 contribui para o desenvolvimento da hipertrofia e falência cardíaca evidenciada em alguns modelos (SUCHAROV; BRISTOW; PORT, 2008; MATKOVICH et al., 2009), plotamos um gráfico de correlação entre a razão da massa cardíaca normalizada pelo comprimento da tibia e a expressão do miRNA-22. Os resultados demonstraram uma correlação positiva entre a hipertrofia cardíaca e o aumento da expressão do miRNA-22 no grupo HF60%, sugerindo que este miRNA pode exercer um potencial papel no estabelecimento da hipertrofia cardíaca desencadeada

pela dieta rica em gordura. No entanto, estudos funcionais *in vivo*, utilizando camundongos knockout para este miRNA, serão fundamentais para corroborar esta hipótese.

A análise de predição, utilizando diferentes bancos de dados, revelou que o miRNA-22 possui 874 potenciais transcritos alvos. Nesta análise identificou-se que a caveolina-1 e a caveolina-3 são dois potenciais candidatos alvos do miRNA-22 em comum aos quatro bancos de dados utilizados na análise de bioinformática. Vários estudos já demonstraram que alterações nos níveis de expressão de caveolina-3 estão associadas à diversas patologias cardiovasculares, incluindo disfunção contrátil, arritmia, hipertrofia cardíaca, isquemia do miocárdio e falência cardíaca (MURFITT et al., 2015). Além disso, um estudo recente em modelo de ratos mostrou que a superexpressão de caveolina-3 foi diretamente inibida pelo miRNA-22 durante processo de isquemia e reperfusão (CHEN; QI; GAO, 2015).

Entretanto, no presente estudo, não foram observadas alterações nos níveis gênicos, nem nos níveis protéicos da caveolina-3, sugerindo que as alterações cardíacas induzidas pela dieta rica em gordura possivelmente não são mediadas por alterações na expressão desta proteína.

Alguns trabalhos também já demonstraram o relevante papel da caveolina-1 para a manutenção do sistema cardiovascular (RAHMAN; SWARD, 2009). Ainda que a caveolina-1 não seja consideravelmente expressa nos cardiomiócitos, ela é abundante nas células não miocíticas do coração, como fibroblastos e células endoteliais (COHEN et al., 2003). Estudos com camundongos knockout para caveolina-1 mostraram um aumento da área de fibrose no coração e no pulmão destes animais (DRAB et al., 2001; RAHMAN; SWARD, 2009), sugerindo que alterações nos níveis de caveolina-1 podem resultar em remodelamento tecidual. Hipertrofia cardíaca e aumento do diâmetro do ventrículo direito também foram encontrados em animais knockout para caveolina-1 (COHEN et al., 2003; ZHAO et al., 2002). Ainda, a deleção do gene da caveolina-1 em camundongos eliminou as cavéolas, o que consequentemente prejudicou a sinalização de cálcio e de óxido nítrico no sistema cardiovascular, causando alterações na contratilidade do coração (RAZANI et al., 2001; LI; EVERSON; SMART, 2005).

No presente estudo os níveis gênicos da caveolina-1 não foram alterados, apenas os níveis protéicos apresentaram um aumento no grupo HF60% tratado por 20 semanas. Como os dados de sequenciamento e a validação por PCR-Taqman não mostraram redução na expressão dos níveis do miRNA-22 no grupo HF60% tratado por 20 semanas, não é possível fazer uma correlação direta entre os níveis de expressão do miRNA-22 e da caveolina-1.

No entanto, como já mencionado anteriormente, o sequenciamento de RNAs dos corações dos animais alimentados com as dietas ricas em gordura mostrou que o padrão de expressão de vários miRNAs foi alterado, o que sugere que outros miRNAs, que também têm como potencial alvo a

caveolina-1, poderiam contribuir para a regulação da expressão desta proteína. Dentre estes miRNAs, destacam-se: miRNA-543-3p, miRNA-494-3p, miRNA-211-5p e miRNA-218-2-3p, os quais apresentam a caveolina-1 como potencial alvo, conforme análise preditiva realizada no banco de dados miRWalk, e cujos níveis de expressão foram diminuídos no grupo tratado com a dieta HF60% por 20 semanas. Todavia, até agora nenhum trabalho validou ainda a caveolina-1 como alvo direto dos miRNAs citados, incluindo o miRNA-22.

Não está clara a razão pela qual os níveis de caveolina-1 no coração dos camundongos alimentados com a dieta HF60% por 20 semanas foram aumentados, mas um estudo realizado por Catalán et al. (2008) sugere que a caveolina-1 desempenha um papel importante na obesidade e no diabetes mellitus do tipo 2. Este estudo demonstrou que a expressão gênica da caveolina-1 foi elevada na gordura visceral e subcutânea de indivíduos obesos em comparação a não obesos (CATALÁN et al., 2008). Além disso, camundongos com deleção no gene da caveolina-1 apresentaram resistência à obesidade induzida por dieta rica em gordura e elevados níveis de triglicérides e ácidos graxos livres no sangue, sugerindo um importante papel da caveolina-1 na manutenção da homeostase lipídica e, em consequência, na obesidade e comorbidades associadas (RAZANI et al., 2002).

Entretanto, para confirmar se a caveolina-1 é de fato alvo do miRNA-22 ou de outros miRNAs alterados no presente modelo, estudos futuros de validação serão necessários. De forma similar, novas pesquisas serão importantes para avaliar se o aumento da expressão da caveolina-1 no coração está envolvido, ao menos em parte, nas alterações morfológicas e funcionais cardíacas desencadeadas pela dieta rica em gordura.

7 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados sugerem que as alterações observadas na morfologia e na função cardíaca desencadeadas em resposta à dieta rica em gordura foram acompanhadas pela alteração na expressão de diversos miRNAs, dentre os quais se destaca o miRNA-22. Considerando que o miRNA-22 está envolvido no desenvolvimento da hipertrofia e falência cardíaca, é possível que algumas destas alterações estruturais e funcionais cardíacas induzidas pela dieta rica em gordura sejam, ao menos em parte, influenciadas pelo aumento da expressão do miRNA-22, via silenciamento de seus mRNAs alvos. No entanto, estudos funcionais *in vivo* serão fundamentais para avaliar a participação do miRNA-22, bem como de outros miRNAs, nas alterações cardíacas induzidas pelas dietas hiperlipídicas.

REFERÊNCIAS*

- ABDELLATIF, M. Differential expression of microRNAs in different disease states. **Circ. Res.**, v. 110, n. 4, p. 638-650, 2012.
- ABDURRACHIM, D. et al. Cardiac diastolic dysfunction in high-fat diet fed mice is associated with lipotoxicity without impairment of cardiac energetics in vivo. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1842, n. 10, p. 1525-1537, 2014.
- ABENTE, E. J. et al. MicroRNAs in obesity-associated disorders. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 589, p. 108-119, 2016.
- AMIN, R. H. et al. Endogenously produced adiponectin protects cardiomyocytes from hypertrophy by a PPARgamma-dependent autocrine mechanism. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 299, n. 3, p. H690-H698, 2010.
- ARITA, Y. et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 257, n. 1, p. 79-83, 1999.
- BALLAL, K. et al. Obesogenic high fat western diet induces oxidative stress and apoptosis in rat heart. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 344, n. 1-2, p. 221-230, 2010.
- BANG, C. et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. **J. Clin. Invest.**, v. 124, n. 5, p. 2136-2146, 2014.
- BARGER, P. M. et al. Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha during cardiac hypertrophic growth. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 12, p. 1723-1730, 2000.
- BAROUCH, L. A. et al. Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice. **Circulation**, v. 108, n. 6, p. 754-759, 2003.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215-233, 2009.
- BOUDINA, S.; ABEL, E. D. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v. 11, n. 1, p. 31-39, 2010.
- CALLIGARIS, S. D. et al. Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. **PLoS One**, v. 8, n. 4, e60931, 2013.
- CALLIS, T. E. et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 119, n. 9, p. 2772-2786, 2009.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CARRER, M. et al. Control of mitochondrial metabolism and systemic energy homeostasis by microRNAs 378 and 378*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 109, n. 38, p. 15330–15335, 2012.

CASTRO, C. H. et al. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 937-942, 2005.

CATALÁN, V. et al. Expression of caveolin-1 in human adipose tissue is upregulated in obesity and obesity-associated type 2 diabetes mellitus and related to inflammation. **Clin. Endocrinol. (Oxf)**, v. 68, n. 2, p. 213-219, 2008.

CEYLAN-ISIK, A. F. et al. Apelin administration ameliorates high fat diet-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 63, p. 4-13, 2013.

CHEN, C. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, n. 20, p. e179, 2005.

CHEN, J. F. et al. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, n. 6, p. 2111-2116, 2008.

CHEN, Z.; QI, Y.; GAO, C. Cardiac myocyte-protective effect of microRNA-22 during ischemia and reperfusion through disrupting the caveolin-3/eNOS signaling. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 8, n. 5, p. 4614-4626, 2015.

CHENG, A. M. et al. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, n. 4, p. 1290-1297, 2005.

CHENG, Y. et al. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? **Am. J. Pathol.**, v. 170, n. 6, p. 1831-1840, 2007.

CHESS, D. B. S. et al. Effects of a high saturated fat diet on cardiac hypertrophy and dysfunction in response to pressure overload. **J. Card. Fail.**, v. 14, n. 1, p. 82-88, 2008.

CINTRA, D. E. et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30571, 2012.

COHEN, A. W. et al. Caveolin-1 null mice develop cardiac hypertrophy with hyperactivation of p42/44 MAP kinase in cardiac fibroblasts. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 284, n. 2, p. C457-C474, 2003.

COX, E. J.; MARSH, S. A. A systematic review of fetal genes as biomarkers of cardiac hypertrophy in rodent models of diabetes. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92903, 2014.

DA COSTA MARTINS, P. A. et al. Conditional dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. **Circulation**, v. 118, n. 15, p. 1567-1576, 2008.

DAVIS-DUSENBERY, B. N.; HATA A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. **J. Biochem.**, v. 148, n. 4, p. 381-392, 2010.

DE PERGOLA, G. et al. Obesity and heart failure. *Endocr. Metab. Immune Disord.* **Drug Targets**, v. 13, n. 1, p. 51-57, 2013.

DWEEP, H.; STICHT, C.; GRETZ, N. In-Silico Algorithms for the Screening of Possible microRNA Binding Sites and Their Interactions. **Curr. Genomics**, v. 14, n. 2, p. 127-136, 2013.

DINIZ, G. P.; TAKANO, A. P.; BARRETO-CHAVES, M. L. MiRNA-208a and miRNA-208b are triggered in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy - Role of type 1 Angiotensin II receptor (AT1R) on miRNA-208a/ α -MHC modulation. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 374, n. 1-2, p. 117-124, 2013.

DORN, G. W. 2nd. MicroRNAs: Redefining mechanisms in cardiac disease. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 56, n. 6, p. 589-595, 2010.

DONG, F. et al. Metallothionein prevents high-fat diet induced cardiac contractile dysfunction: role of peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1alpha and mitochondrial biogenesis. **Diabetes**, v. 56, n. 9, p. 2201-2212, 2007.

DRAB, M. et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. **Science**, v. 293, n. 5539, p. 2449-2452, 2001.

DRESIOS, J. et al. Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, n. 6, p. 1865-1870, 2005.

DU TOIT, E. F.; NABBEN, M.; LOCHNER, A. Potential role for angiotensin II in obesity induced cardiac hypertrophy and ischaemic/reperfusion injury. **Basic Research in Cardiology**, v. 100, n. 4, p. 346-354, 2005.

FAROOQI, S.; O'RAHILLY, S. Genetics of obesity in humans. **Endocr. Rev.**, v. 27, n. 7, p. 710-718, 2006.

FINCK, B. N. et al. A critical role for PPARalpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, n. 3, p. 1226-1231, 2003.

FINCK, B. N.; KELLY D. P. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. **Circulation**, v. 115, n. 19, p. 2540-2548, 2007.

FRANK, P. G. et al. Caveolae and caveolin-1: novel potential targets for the treatment of cardiovascular disease. **Curr. Pharm. Des.**, v. 13, n. 17, p. 1761-1769, 2007.

FRIESE, R. S. et al. MicroRNA-22 and promoter motif polymorphisms at the Chga locus in genetic hypertension: functional and therapeutic implications for gene expression and the pathogenesis of hypertension. **Hum. Mol. Genet.**, v. 22, n. 18, p. 3624-3640, 2013.

GLADKA, M. M.; DA COSTA MARTINS, P. A.; DE WINDT, L. J. Small changes can make a big difference - microRNA regulation of cardiac hypertrophy. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 52, n. 1, p. 74-82, 2012.

GREGORY, R. I. et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. **Nature**, v. 432, n. 7014, p. 235-240, 2004.

GRUETER, C. E. et al. A cardiac microRNA governs systemic energy homeostasis by regulation of MED13. **Cell**, v. 149, n. 3, p. 671-683, 2012.

GUEDES, E. C. et al. MicroRNA expression signature is altered in the cardiac remodeling induced by high fat diets. **J. Cell. Physiol.**, 2015. In press.

GURHA, P. et al. Targeted deletion of microRNA-22 promotes stress-induced cardiac dilation and contractile dysfunction. **Circulation**, v. 125, n. 22, p. 2751-2761, 2012.

GURHA, P. et al. MicroRNA-22 promotes heart failure through coordinate suppression of PPAR/ERR-nuclear hormone receptor transcription. **PLoS One**, v. 8, n. 9, e75882, 2013.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 15, n. 8, p. 509-524. 2014.

HAFSTAD, A. D. et al. High- and moderate-intensity training normalizes ventricular function and mechanoenergetics in mice with diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 62, n. 7, p. 2287-2294, 2013.

HAMMOND, S. M. An overview of microRNAs. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 87, p. 3-14, 2015.

HARPER, A. R. et al. Common variation neighbouring micro-RNA 22 is associated with increased left ventricular mass. **PLoS One**, v. 8, n. 1, e55061, 2013.

HOUBAVIY, H. B.; MURRAY, M. F.; SHARP, P. A. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. **Dev. Cell**, v. 5, n. 2, p. 351-358, 2003.

HUA, Y. et al. Cathepsin K knockout mitigates high-fat diet-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction. **Diabetes**, v. 62, n. 2, p. 498-509, 2013.

HUANG, X. et al. Resistance to diet-induced obesity and improved insulin sensitivity in mice with a regulator of G protein signaling-insensitive G184S Gnai2 allele. **Diabetes**, v. 57, n. 1, p. 77-85, 2008.

HUANG, Z. P. et al. MicroRNA-22 regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress. **Circ. Res.**, v. 112, n. 9, p. 1234-1243, 2013.

HUANG, Z. P.; WANG, D. Z. MiR-22 in cardiac remodeling and disease. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 24, n. 7, p. 267-272, 2014.

ILIOPOULOS, D. et al. Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. **PLoS One**, v. 3, n. 11, p. e3740, 2008.

IWAKAWA, H. O.; TOMARI, Y. The functions of MicroRNAs: mRNA decay and translational repression. **Trends Cell Biol.**, v. 25, n. 11, p. 651-665, 2015.

JAZBUTYTE, V. et al. MicroRNA-22 increases senescence and activates cardiac fibroblasts in the aging heart. **Age (Dordr)**, v. 35, n. 3, p. 747-762, 2013.

KARBOWSKA, J.; KOCHAN, Z.; SMOLEŃSKI, R. T. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is downregulated in the failing human heart. **Cell Mol. Biol. Lett.**, v. 8, n. 1, p. 49-53, 2003.

KARDASSIS, D. et al. The influence of body composition, fat distribution and sustained weight loss on left ventricular mass and geometry in obesity. **Obesity (Silver Spring)**, v. 20, n. 3, p. 605-611, 2012.

KARMAZYN, M.; GAN, X. T; RAJAPUROHITAM, V. The potential contribution of circulating and locally produced leptin to cardiac hypertrophy and failure. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 91, n. 11, p. 883-888. 2013.

KARMAZYN, M.; RAJAPUROHITAM, V. Leptin as a cardiac pro-hypertrophic factor and its potential role in the development of heart failure. **Curr. Pharm. Des.**, v. 20, n. 4, p. 646-651, 2014.

KE, L. et al. The effect and pathophysiological mechanism of high free fatty acids (FfAs) on the cardiac structure and function. **Sichuan Da XueXueBao Yi XueBan.**, v. 40, n. 1, p. 24-28, 2009.

KAWANO, J.; ARORA, R. The role of adiponectin in obesity, diabetes, and cardiovascular disease. **J. Cardiometab. Syndr.**, v. 4, n. 1, p. 44-49, 2009.

KEHAT, I.; MOLKENTIN, J. D. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. **Circulation**, v. 122, n. 25, p. 2727-2735, 2010.

KISHIMOTO, H. et al. Physiological functions of Pten in mouse tissues. **Cell Struct. Funct.**, v. 28, n. 1, p. 11-21, 2003.

KOJIMA, S. et al. The variation of plasma concentrations of a novel, adipocyte derived protein, adiponectin, in patients with acute myocardial infarction. **Heart**, v. 89, n. 6, p. 667, 2003.

LAGOS-QUINTANA, M. et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 853-858, 2001.

LANGENDORFF, O. Untersuchungen an überlebenden Säugetierherzen. **Pflügers Arch.**, v. 61, p. 291-332, 1895.

LANGMEAD, B. et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biol.**, v. 10, n. 3, R25, 2009.

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

LI, X. A.; EVERSON, W. V.; SMART, E. J. Caveolae, lipid rafts, and vascular disease. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 15, n. 3, p. 92-96, 2005.

LITTLEJOHNS, B. et al. Hearts from mice fed a non-obesogenic high-fat diet exhibit changes in their oxidative state, calcium and mitochondria in parallel with increased susceptibility to reperfusion injury. **PLoS One**, v. 9, n. 6, e100579, 2014.

MADANI, S. et al. Direct effects of leptin on size and extracellular matrix components of human pediatric ventricular myocytes. **Cardiovasc. Res.**, v. 69, n. 3, p. 716-725, 2006.

MADRAZO, J. A.; KELLY, D. P. The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 44, n. 6, p. 968-975, 2008.

MAHAJAN, R.; LAU, D. H.; SANDERS, P. Impact of obesity on cardiac metabolism, fibrosis, and function. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 25, n. 2, p. 119-126, 2015.

MAILLET, M.; VAN BERLO, J. H.; MOLKENTIN, J. D. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 14, n. 1, p. 38-48, 2013.

MATKOVICH, S. J. et al. Reciprocal regulation of myocardial microRNAs and messenger RNA in human cardiomyopathy and reversal of the microRNA signature by biomechanical support. **Circulation**, v. 119, n. 9, p. 1263–1271, 2009.

MARCO, A.; GRIFFITHS-JONES, S. Detection of microRNAs in color space. **Bioinformatics**, v. 28, n. 3, p. 318-323, 2012.

MARCOTORCHINO, J. et al. Vitamin D protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. **J. Nutr. Biochem.**, v. 25, n. 10, p. 1077-1083, 2014.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, E. et al. Galectin-3 Participates in Cardiovascular Remodeling Associated With Obesity. **Hypertension**, v. 66, n. 5, p. 961-969, 2015.

MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412-419, 1985.

MESSERLI, F.H. Cardiovascular effects of obesity and hypertension. **Lancet**, v. 1, n. 8282, p. 1165-1168, 1982.

MIRBASE. Disponível em: <http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000078>. Acesso em: 14 jan. 2016.

MOKDAD, A. H. et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors. **JAMA**, v. 289, n. 1, p. 76-79, 2003.

MURFITT, L., et al. Targeting caveolin-3 for the treatment of diabetic cardiomyopathy. **Pharmacol. Ther.**, v.151, p. 50-71, 2015.

NAGALINGAM, R. S. et al. A cardiac-enriched microRNA, miR-378, blocks cardiac hypertrophy by targeting Ras signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 288, n. 16, p. 11216-11232, 2013.

NAGPAL, V. et al. MiR-125b is critical for fibroblast-to-myofibroblast transition and cardiac fibrosis. **Circulation**, 2015. In press.

NAKAMURA, Y. et al. Implications of plasma concentrations of adiponectin in patients with coronary artery disease. **Heart**, v. 90, n. 5, p. 528–533, 2004.

NEPPL, R. L.; WANG, D. Z. The myriad essential roles of microRNAs in cardiovascular homeostasis and disease. **Genes Dis.**, v. 1, n. 1, p. 18-39, 2014.

NOYAN-ASHRAF, M. H. et al. A glucagon-like peptide-1 analog reverses the molecular pathology and cardiac dysfunction of a mouse model of obesity. **Circulation**, v. 127, n. 1, p. 74-85, 2013.

- OGDEN, C.L. et al. Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. **JAMA**, v. 311, n. 8, p. 806-814, 2014.
- OKERE, I. C. et al. Low carbohydrate/high-fat diet attenuates cardiac hypertrophy, remodeling, and altered gene expression in hypertension. **Hypertension**, v. 48, n. 6, p. 1116–1123, 2006.
- OLENA, A. F.; PATTON, J. G. Genomic organization of microRNAs. **J. Cell. Physiol.**, v. 222, n. 3, p. 540-545. 2010.
- OLSON, E.N. MicroRNAs as therapeutic targets and biomarkers of cardiovascular disease. **Sci. Transl. Med.**, v. 6, n. 239, 239ps3, 2014.
- PENG, Y. et al. MicroRNAs: emerging roles in adipogenesis and obesity. **Cell Signal.**, v. 26, n. 9, p. 1888-1896, 2014.
- PEREIRA, L. O.; DE FRANCISCHI, R. P.; LANCHI, A. H. Obesidade: Hábitos Nutricionais, Sedentarismo e Resistência à Insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 47, n. 2, p. 111-127, 2003.
- POUDYAL, H. et al. Chronic high-carbohydrate, high-fat feeding in rats induces reversible metabolic, cardiovascular, and liver changes. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 302, n. 12, p. E1472–E1482, 2012.
- QIN, F. et al. The polyphenols resveratrol and S17834 prevent the structural and functional sequelae of diet-induced metabolic heart disease in mice. **Circulation**, v. 125, n. 14, p. 1757-1764, 2012.
- RAJAPUROHITAM, V. et al. The obesity-associated peptide leptin induces hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. **Circ. Res.**, v. 93, n. 4, p. 277–279, 2003.
- RAHMAN, A.; SWÄRD, K. The role of caveolin-1 in cardiovascular regulation. **Acta Physiol. (Oxf.)**, v. 195, n. 2, p. 231-245, 2009.
- RAZANI, B. et al. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 41, p. 38121-38138, 2001.
- RAZANI, B. et al. Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 10, p. 8635-8647, 2002.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H., FAHEY, G. C.Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.
- RIBEIRO, A. L. P. et al. Cardiovascular health in Brazil trends and perspectives. **Circulation**, v. 133, p. 422-433, 2016.
- ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010.
- SCHAUB, M. C. et al. Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. **J. Mol. Med.**, v. 75, n. 11-12, p. 901-920, 1997.

- SCHRAM, K. et al. Increased expression and cell surface localization of MT1-MMP plays a role in stimulation of MMP-2 activity by leptin in neonatal rat cardiac myofibroblasts. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 44, n. 5, p. 874-881, 2008.
- SHARMA, N. et al. Potential impact of carbohydrate and fat intake on pathological left ventricular hypertrophy. **Cardiovasc. Res.**, v. 73, n. 2, p. 257-268, 2007.
- SHIBATA, R. et al. Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. **Nat. Med.**, v. 10, n. 12, p. 1384-1389, 2004.
- SONG, M. A. et al. Differential expression of microRNAs in ischemic heart disease. **Drug Discov. Today**, v. 20, n. 2, p. 223-235, 2015.
- SUCHAROV, C.; BRISTOW, M. R.; PORT, J. D. MiRNA expression in the failing human heart: functional correlates. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 45, n. 2, p. 185–192, 2008.
- SWEENEY, G. Cardiovascular effects of leptin. **Nat. Rev. Cardiol.**, v. 7, n. 1, p. 22-29, 2010.
- TEEKAKIRIKUL, P. et al. Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf- β . **J. Clin. Invest.**, v. 120, n. 10, p. 3520-3529, 2010.
- THUM, T. et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. **Circulation**, v. 116, n. 3, p. 258-267, 2007.
- THUM, T. et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. **Nature**, v. 456, n. 7224, p. 980-984, 2008.
- TIKELLIS, C. et al. Cardiac inflammation associated with a Western diet is mediated via activation of RAGE by AGEs. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 295, n. 2, p. E323-E330, 2008.
- TU, Y. et al. MicroRNA-22 Downregulation by atorvastatin in a mouse model of cardiac hypertrophy: a new mechanism for antihypertrophic intervention. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 31, n. 6, p. 997-1008, 2013.
- TURDI, S. et al. Deficiency in AMP-Activated Protein Kinase Exaggerates High Fat Diet-Induced Cardiac Hypertrophy and Contractile Dysfunction. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 50, n. 4, p. 712–722, 2011.
- TURKBAY, E. B. et al. The impact of obesity on the left ventricle: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). **JACC Cardiovasc. Imagin.**, v. 3, n. 3, p. 266-274, 2010.
- VAN ROOIJ, E. et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 48, p. 18255-18260, 2006.
- VAN ROOIJ, E. et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, n. 35, p. 13027-13032, 2008.
- VAN ROOIJ, E. The art of microRNA research. **Circ. Res.**, v. 108, n. 2, p. 219-234, 2011.
- WABITSCH, M. et al. Biologically inactive leptin and early-onset extreme obesity. **N. Engl. J. Med.**, v. 372, n. 1, p. 48-54, 2015.

- WANG, K. et al. Cardiac hypertrophy is positively regulated by microRNA miR-23a. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 1, p. 589-599, 2012.
- WHALEY-CONNELL, A.; SOWERS, J. R. Indices of obesity and cardiometabolic risk. **Hypertension**, v. 58, n. 6, p. 991-993, 2011.
- WILSON, C. R. et al. Western diet, but not high fat diet, causes derangements of fatty acid metabolism and contractile dysfunction in the heart of Wistar rats. **Biochem. J.**, v. 406, n. 3, p. 457-467, 2007.
- WISSE, B. E.; KIM, F.; SCHWARTZ, M. W. Physiology. An integrative view of obesity. **Science**, v. 318, n. 5852, p. 928-929, 2007.
- WOODIWISS, A. J. et al. Obesity Promotes Left Ventricular Concentric Rather Than Eccentric Geometric Remodeling and Hypertrophy Independent of Blood Pressure. **Am. J. Hypert.**, v. 21, n. 10, p. 1144-1151, 2008.
- WU, L. et al. Influence of lifestyle on the FAIM2 promoter methylation between obese and lean children: a cohort study. **BMJ Open**, v. 5, n. 4, e007670, 2015.
- XIONG, J. Emerging roles of microRNA-22 in human disease and normal physiology. **Curr. Mol. Med.**, v. 12, n. 3, p. 247-258, 2012.
- XU, F. P. et al. Leptin induces hypertrophy via endothelin-1-reactive oxygen species pathway in cultured neonatal rat cardiomyocytes. **Circulation**, v. 110, n. 10, p. 1269-1275, 2004.
- XU, P.; GUO, M.; HAY, B. A. MicroRNAs and the regulation of cell death. **Trends Genet.**, v. 20, n. 12, p. 617-624, 2004.
- XU, X. D. et al. Attenuation of microRNA-22 derepressed PTEN to effectively protect rat cardiomyocytes from hypertrophy. **J. Cell Physiol.**, v. 227, n. 4, p. 1391-1398, 2012.
- YANG, J. et al. MicroRNA-22 targeting CBP protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through anti-apoptosis in rats. **Mol. Biol. Rep.**, v. 41, n. 1, p. 555-561, 2014.
- YANG, J. S. et al. Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. **RNA**, v. 17, n. 2, p. 312-326, 2011.
- YUAN, X. et al. Clustered microRNAs' coordination in regulating protein-protein interaction network. **BMC Syst. Biol.**, v. 3, n. 65, 2009.
- ZENG, H. et al. High-fat diet induces cardiac remodelling and dysfunction: assessment of the role played by SIRT3 loss. **J. Cell Mol. Med.**, v. 19, n. 8, p. 1847-1856, 2015.
- ZHAO, Y. Y. et al. Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 17, p. 11375-11380, 2002.
- ZIBADI, S. et al. Leptin's regulation of obesity-induced cardiac extracellular matrix remodeling. **Cardiovasc. Toxicol.**, v. 11, n. 4, p. 325-333, 2011.

APÊNDICE A – Análises Histológicas: diâmetro transverso de cardiomiócitos

Figura 1A. Imagem representativa da análise do diâmetro transverso de cardiomiócitos de camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) por 10 (A) e por 20 semanas (B), no aumento de 40X.

APÊNDICE B – Análises Histológicas: deposição de colágeno

Figura 1B. Imagem representativa da deposição de colágeno no coração de camundongos submetidos à dieta controle e às dietas hiperlipídicas (HF45% e HF60%) por 10 (A) e por 20 semanas (B), no aumento de 40X.