TÁBATHA DE OLIVEIRA SILVA

PAPEL DO MICRORNA-22 NAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E METABÓLICAS INDUZIDAS PELA OBESIDADE EM CAMUNDONGOS FÊMEAS

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

SÃO PAULO 2020

TÁBATHA DE OLIVEIRA SILVA

PAPEL DO MICRORNA-22 NAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E METABÓLICAS INDUZIDAS PELA OBESIDADE EM CAMUNDONGOS FÊMEAS

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

Área de concentração: Biologia Morfofuncional.

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Placoná Diniz.

Sede: Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional.

Versão corrigida.

SÃO PAULO 2020

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Oliveira Silva, Tábatha
 PAPEL DO MICRORNA-22 NAS ALTERAÇÕES
CARDIOVASCULARES E METABÓLICAS INDUZIDAS PELA
OBESIDADE EM CAMUNDONGOS FÊMEAS / Tábatha de
Oliveira Silva; orientadora Gabriela Placoná Diniz.
-- São Paulo, 2020.
115 p.
Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.
1. miR-22. 2. obesidade. 3. hipertrofia cardíaca.
4. fêmeas. 5. metabolismo. I. Placoná Diniz,
Gabriela, orientador. II. Título.

Candidato(a): Tábatha de Oliveira Silva.

Título da Dissertação: Papel do microRNA-22 nas alterações cardiovasculares e metabólicas induzidas pela obesidade em camundongos fêmeas.

Orientador: Dra. Gabriela Placoná Diniz.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a **18 de novembro de 2020** considerou o(a) candidato(a):

) Reprovado(a)

(X) Aprovado(a) (

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome: Marcela Sorelli Carneiro Ramos
	Instituição: Departamento de Biologia Celular e Molecular Universidade Federal do ABC.
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome: Patricia Chakur Brum
	Instituição: Departamento de Biodinâmica do Movimento do Corpo Humano da Escola de Educação Física e Esportes da Universidade de São Paulo.
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome: Patricia Pereira Coltri
	Instituição: Departamento de Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
Presidente:	Assinatura:
	Nome: Gabriela Placoná Diniz
	Instituição: Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.



Universidade de São Paulo Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta Intitulada "Papel do miRNA-22 nas alterações cardiovasculares e metabólicas induzidas pela obesidade", protocolada sob o CEUA nº 9249190719, sob a responsabilidade de **Gabriela Placoná Diniz** e equipe; Tabatha de Oliveira Silva; Caroline Antunes Lino; Camila Stephanie Balbino Silva - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 20/09/2019.

We certify that the proposal "Role of miRNA-22 in the cardiovascular and metabolic alterations induced by obesity", utilizing 200 Genetically modified mice (GMO) (100 males and 100 females), 200 Heterogenics rats (100 males and 100 females), 100 Isogenics mice (50 males and 50 females), protocol number CEUA 9249190719, under the responsibility of **Gabriela Placoná Diniz** and team; Tabatha de Oliveira Silva; Caroline Antunes Lino; Camila Stephanie Balbino Silva - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 09/20/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: 48 meses

Depto/Setor: Anatomia

Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Machos	Idade ou peso:	1 a 24 meses
Linhagem:	Knockout para miRNA-22			N amostral:	100
Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexoc	Fémeas	Idade ou peso:	1 a 24 meses
Linhagem:	Knockout para miRNA-22			N amostral:	100
Origem:	Biotério de Produção de Ratos da Rede de I	Biotérios	da USP - Profa.	Dra. Zuleica Bruno Fort	5
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos	Idade ou peso:	1 a 2 dias
Linhagem:	: Wistar			N amostral:	100
Origem:	Biotério de Produção de Ratos da Rede de I	Biotérios	da USP - Profa.	Dra. Zuleica Bruno Fort	5
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	1 a 2 dias
Linhagem:	: Wistar			N amostral:	100
Origem:	Biotério Central FMUSP				
Espécie:	Camundongos isogénicos	sexo:	Machos	Idade ou peso:	4 a 24 meses
Linhagem:	: C57/BI6			N amostral:	50
Origem:	Biotério Central FMUSP				
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fémeas	Idade ou peso:	4 a 24 meses
Linhagem:	: C57/BI6			N amostral:	50

São Paulo, 12 de agosto de 2020

As. Professor Linea Prestes, 2415 - KB III / Cidade Universitiária, Butantà - CEP 05508-000 - São faula;5P - tel: 55 (11) 3091-7733 Hotário de atendimento: 34 a 64 das 0 às 16h : e-mail: cap@ict.uap.br CEUM N 9249129719



Universidade de São Paulo Comissão de Ética no Uso de Animais

Juciane Valiria Sita Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Dr. Alexandre Ceroni Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III / Oldete Universitäria, Butantk - CEP 05508-000 - São PauloSP - tel: 55 (11) 3091-7733 Honirio de atendimento: 24 a 64 das 8 às 16h : e-mail: cep@kb.usp.br CEUA N 9249130719

Aos meus queridos avós, Antônio e Antônia. Vocês são a razão desse sonho se tornar realidade!

Aos meus pais, Aderlaine e Ana Lúcia e meus irmãos Samantha e Érick, pelo amor e carinho desmedido.

Ao Ronaldo, meu amor, por comemorar comigo a cada conquista e por me dar tanto apoio nos momentos difíceis.

Amo vocês infinitamente!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela eterna graça e por me sustentar até aqui, me dando forças para cumprir meus objetivos.

Aos meus queridos familiares, que mesmo distantes, sempre se fizeram presentes. Obrigada pelo imensurável amor, carinho, incentivo e apoio durante minha jornada. Não há outra forma de agradecer se não dizendo agora e sempre que eu os amo!

À minha querida orientadora, que acreditou em mim desde o início. Meu eterno e mais sincero agradecimento pela confiança, por todos os ensinamentos, conselhos, oportunidades, paciência e amizade! É profunda a admiração que tenho por você.

À professora Maria Luiza, pelo carinho e afeto. Obrigada por todos os incentivos e ensinamentos, dos quais levarei comigo para sempre.

À melhor técnica de laboratório, Marina Fevereiro, obrigada pelo suporte.

Aos meus queridos amigos de laboratório, que sempre estiveram dispostos a me ajudar, Caroline, Juliane, Camila, Vanessa, Guilherme, Aline, Cláudia, Renata, Jeniffer e Letícia. Família LBCAF, é imenso o carinho que tenho por vocês! Obrigada por todos os momentos que passamos juntos.

Às minhas amigas do departamento, Dúnia, Roberta, Wenddy e Camilla. Estar com vocês trouxe alegria para meus dias!

Aos nossos colaboradores do Hospital Sírio Libanês (Dr. Pedro Galante, Dra. Paula Asprino e Dra. Vanessa Buzatto), Harvard Medical School (Dr. Dazhi Wang e Dr. Yao Wei Lu), Instituto do Coração (Dra. Maria Cláudia Irigoyen e Dr. Leonardo Jensen) e do Instituto de Ciências Biomédicas (Dr. José Donato, Dra. Alice Rodrigues e Márcio Ribeiro) e à todas as pessoas que contribuíram diretamente e indiretamente para realização deste trabalho. Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2018/10338-2.

"Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes".

Isaac Newton

RESUMO

De Oliveira Silva, T. **Papel do microRNA-22 nas alterações cardiovasculares e metabólicas induzidas pela obesidade em camundongos fêmeas**. 2020. 115f. Dissertação de Mestrado (Programa em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A prevalência de sobrepeso e obesidade tem aumentado em diversos países, inclusive no Brasil. Indivíduos obesos apresentam diversas alterações metabólicas e cardiovasculares, as quais contribuem para o aumento da morbidade e mortalidade nesta população. Diversos estudos têm reportado a importante contribuição dos microRNAs na patogênese de doenças cardiovasculares e metabólicas. Nesse estudo, avaliamos o impacto do microRNA-22 (miR-22) nos distúrbios cardiovasculares e metabólicos promovidos pela obesidade induzida por dieta hipercalórica em camundongos fêmeas. Descobrimos que a deleção do miR-22 atenua o ganho de peso corpóreo, adiposidade e previne a resistência à insulina e dislipidemia promovidos pela obesidade. Ainda, demonstramos que fêmeas knockouts para o miR-22 (KO) exibiram hipertrofia cardíaca sem disfunção ventricular esquerda e fibrose do miocárdio. Análise de sequenciamento de RNAs mostrou que a deleção do miR-22 e a dieta hipercalórica alteraram o perfil de expressão de RNAm no coração e as análises de enriquecimento de vias revelaram o aumento na expressão de genes associados à força de contração e oxidação de ácidos graxos no coração das fêmeas WT obesas. Além disso, observamos um aumento de genes relacionados ao crescimento do coração e às respostas do hormônio tireoidiano no coração das fêmeas KO. Curiosamente, as fêmeas obesas com deleção do miR-22 exibiram níveis reduzidos de RNAm de Calm1, Yap1, Egfr e Tgfbr1 no coração em comparação com as controles. Em conjunto, nossos resultados demonstraram, pela primeira vez, que a deleção do miR-22 induz hipertrofia cardíaca em fêmeas sem prejuízo da função miocárdica e sugerem o miR-22 como um potencial alvo terapêutico para o tratamento de distúrbios metabólicos relacionados à obesidade em fêmeas.

Palavras-chave: miR-22; obesidade; hipertrofia cardíaca; disfunções metabólicas; fêmeas.

ABSTRACT

De Oliveira Silva, T. Role of microRNA-22 in obesity-induced cardiovascular and metabolic dysfunctions in female mice. 2020. 115f. Masters thesis (Life Sistems) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The prevalence of overweight and obesity has increased in several countries, including Brazil. Obese individuals have several metabolic and cardiovascular complications, which contribute to increased morbidity and mortality in this population. Several studies have shown the important contribution of microRNAs in the pathogenesis of cardiovascular and metabolic disorders. In this study, we evaluated the impact of microRNA-22 (miR-22) on cardiovascular and metabolic disorders promoted by hypercaloric diet-induced obesity in female mice. We found that miR-22 deletion attenuates obesity-induced body weight gain and adiposity in females, as well as to prevent insulin resistance and dyslipidemia. In addition, we demonstrated that miR-22 knockout (KO) females exhibited cardiac hypertrophy without left ventricular dysfunction and myocardial fibrosis. RNA sequencing analysis showed that both miR-22 deletion and hypercaloric diet were able to change the mRNA expression profiles in the heart. Pathway enrichment analyzes revealed an increase in expression of genes associated with the regulation of the heart contraction force and oxidation of fatty acids in the heart of obese WT females. In addition, we observed an increase in expression of genes related to thyroid hormone responses and heart growth signaling in the heart of KO females. Curiously, miR-22 KO obese females exhibited reduced mRNA levels of Calm1, Yap1, Egfr, and Tgfbr1 in the heart compared to control KO females. Together, our results demonstrated, for the first time, that deletion of miR-22 induces cardiac hypertrophy in females without affecting myocardial function and suggest miR-22 as a potential therapeutic target for the treatment of obesity-related metabolic disorders in females.

Keywords: miR-22; obesity; cardiac hypertrophy; metabolic disorders; females.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proporção de adultos obesos no mundo26
Figura 2. Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs32
Figura 3. Delineamento experimental do estudo realizado no Capítulo 137
Figura 4. Delineamento experimental do estudo realizado no Capítulo 2
Figura 5. Delineamento experimental do estudo realizado no Capítulo 3
Figura 6. A dieta hiperlipídica não foi eficaz em induzir obesidade em fêmeas 51
Figura 7. A dieta hiperlipídica não promoveu intolerância à glicose em fêmeas52
Figura 8. A dieta hiperlipídica não promoveu aumento da massa cardíaca em fêmeas
Figura 9. A dieta hipercalórica promoveu obesidade em camundongos fêmeas
Figura 10. A dieta hipercalórica promoveu aumento da adiposidade em fêmeas
Figura 11. As fêmeas tratadas com dieta hipercalórica desenvolveram intolerância à glicose e resistência à insulina
Figura 12. A deleção do miR-22 atenua o ganho de peso corpóreo promovido pela dieta hipercalórica em fêmeas61
Figura 13. A deleção do miR-22 atenua a adiposidade promovida pela dieta hipercalórica em fêmeas63
Figura 14. A deleção do miR-22 atenua a adipogênese e aumenta a lipólise no tecido adiposo branco das fêmeas
Figura 15. A deleção do miR-22 previne a dislipidemia induzida pela obesidade em fêmeas

Figura 16. A deleção do miR-22 previne a resistência à insulina observada na obesidade
Figura 17. A deleção do miR-22 atenua a β-oxidação no músculo esquelético de fêmeas obesas
Figura 18. A deleção do miR-22 promove hipertrofia cardíaca em fêmeas75
Figura 19. Influência da deleção do miR-22 e da dieta na expressão gênica de marcadores hipertróficos e fibróticos
Figura 20. Influência da dieta e da deleção do miR-22 no número de genes diferencialmente expressos
Figura 21. Perfil dos genes diferencialmente expressos no coração de camundongos fêmeas
Figura 22. A deleção do miR-22 e a obesidade alteram o perfil de genes diferencialmente expressos no coração de camundongos fêmeas
Figura 23. Vias biológicas enriquecidas no coração de camundongos fêmeas
Figura 24. A deleção do miR-22 e a dieta hipercalórica alteram a expressão de genes relacionados à hipertrofia cardíaca
Figura 25. Proposta do possível mecanismo de ação do miR-22 nos camundongos fêmeas
Apêndice 1: Caracterização do tecido adiposo marrom nas fêmeas WT e KO para o miR-22 tratadas com dieta controle e hipercalórica105
Apêndice 2: Caracterização do fígado nas fêmeas WT e KO para o miR-22 tratadas com dieta controle e hipercalórica106
Apêndice 3: Análise de PCA das amostras do RNAseq107

Apêndice 4: Vias reprimidas no coração das fêmeas......108

Apêndice 5: Lista de genes obtidos através da análise de agrupamento do Diagrama de Venn demonstrando a sobreposição entre os grupos......110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Conteúdo calórico das dietas controle e hiperlipídica40
Tabela 2: Protocolo utilizado no termociclador para a PCR41
Tabela 3. Características das fêmeas C57BL/6 tratadas com dieta controle ou hiperlipídica associada ao leite condensado (LC) ou frutose (F) após 12 semanas
de tratamento59
Tabela 4. Características do músculo esquelético70
Tabela 5. Parâmetros hemodinâmicos e ecocardiográficos77

LISTA DE ABREVIATURAS

- Acta1 Alfa actina de músculo esquelético
- ATGL Lipase triglicerídica adiposa
- AMPK Quinase ativada por AMP
- ACC Acetil-CoA carboxilase
- ALDH2 Aldeído desidrogenase 2
- AUC Área sob a curva
- **BHADH** β-hidroxiacil-CoA
- CK Creatina quinase
- **CS** Citrato sintase
- CPT1 Carnitina palmitoiltransferase I
- **C** Dieta controle
- **C/EBPα** Proteína α de ligação ao intensificador de CCAAT
- Calm1 Calmodulina 1
- Col1a1 Colágeno alfa 1 do tipo 1
- Col3a1 Colágeno alfa 1 do tipo 3
- dL Decilitro
- **DCV** Doença cardiovascular
- Deg Gene diferencialmente expresso
- Efgr Receptor do fator de crescimento epidérmico

- E/A Velocidade do relaxamento do ventrículo esquerdo na diástole inicial/tardia
- **EF** Fração de ejeção
- FS Fração de encurtamento
- FC Frequência cardíaca
- FC-E Frequência cardíaca durante análise de ecocardiografia

Fgfr1 Receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos

g	Gramas
нк	Hexoquinase
Нс	Dieta hipercalórica
Hsp90ab1	Proteína de choque térmico 90 da família alfa membro da classe B1
HSL	Lipase sensível ao hormônio
iGTT	Teste de tolerância à glicose
ІТТ	Teste de tolerância à insulina
IVSd	Septo interventricular na diástole
IVSs	Septo interventricular na sístole
IVCT	Tempo de contração isovolumétrico
IVRT	Tempo de relaxamento isovolumétrico
КО	Camundongo knockout para o miR-22
kITT	Taxa de decaimento da glicose no sangue
LVPWd	Parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole

LVPWs	Parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole
-------	--

- LVIDd Dimensão interna do ventrículo esquerdo na diástole
- LVIDs Dimensão interna do ventrículo esquerdo na sístole
- miR microRNA
- miR-22 microRNA-22
- Myh6 Alfa miosina de cadeia pesada
- Myh7 Beta miosina de cadeia pesada
- mm Milímetros
- mg Micrograma
- Mol Molar
- ng Nanograma
- **pb** Pares de base
- PFK Fosfofrutoquinase
- PK Piruvato quinase
- PAC Pressão arterial caudal
- Ppia Peptidilprolil isomerase A
- Pgc1αCo-ativador gama 1 alfa do receptor ativado por proliferador de
peroxissomo
- PCR Reação em cadeia da polimerase
- **qPCR** PCR em tempo real
- Rhoa Membro da família A homóloga Ras

RNAseq	Sequenciamento de RNA de última geração
ТАМ	Tecido adiposo marrom
ТАР	Tecido adiposo branco perigonadal
TAR	Tecido adiposo branco retroperitoneal
TAS	Tecido adiposo branco subcutâneo
Tgfbr1	Receptor beta do fator de crescimento transformador I
Thra	Receptor alfa do hormônio tireoidiano
TLCD2	Domínio TLC contendo 2
UTR	Região não traduzida
UCP1	Proteína desacopladora 1
hð	Micrograma
WT	Camundongo selvagem
WDR81	Domínio de repetição WD81
Yap1	Regulador transcricional associado Yes1

LISTA DE SÍMBOLOS

α Alfa

β Beta

= Igual

μ Micro

> Maior

< Menor

≤ Menor ou igual

% Porcentagem

SUMÁRIO

1.	INT	RODUÇÃO	. 23
2.	RE	VISÃO DA LITERATURA	. 25
	2.1.	Impacto da obesidade na saúde	. 25
	2.2.	Obesidade e doenças cardiovasculares	. 27
	2.3.	Dimorfismo sexual no fenótipo cardiometabólico	. 29
	2.4.	miRNAs	. 30
	2.5.	miR-22	. 33
3.	MA	TERIAIS E MÉTODOS	. 37
	3.1.	Delineamento experimental	. 37
	3.2.	Cuidados éticos	. 39
	3.3.	Animais da pesquisa	. 39
	3.4.	Tratamento e dieta	. 39
	3.5.	Genotipagem	. 40
	3.6.	Análise da composição corpórea por Ressonância Magnética	. 41
	3.7.	Parâmetros hemodinâmicos	. 41
	3.8.	Ecocardiograma	. 42
	3.9.	Glicemia de jejum	. 42
	3.10.	Teste de tolerância à glicose e teste de tolerância à insulina	. 43
	3.11.	Pesagem dos tecidos	. 43
	3.12.	Dosagem bioquímica	. 43
	3.13.	Análises histológicas	. 44
	3.14.	Análise por PCR em tempo real (qPCR)	. 44
	3.15.	Western blot	. 46
	3.16.	Atividade enzimática	. 46
	3.17.	Sequenciamento de RNA (RNAseq)	. 47

3.18.	Quantificação da expressão gênica e análises de expressão gênica
difer	encial
3.19.	Análise de enriquecimento de vias biológicas48
3.20.	Análise dos dados 48
Capítu	lo 1: Caracterização do modelo de obesidade em fêmeas
4. RE	SULTADOS E DISCUSSÃO
4.1.	A dieta rica em gordura não induz obesidade em fêmeas 50
4.2.	A dieta hiperlipídica não induziu intolerância à glicose em fêmeas. 51
4.3.	A dieta hiperlipídica não induziu hipertrofia cardíaca em fêmeas 52
Capítu	lo 2: Estabelecimento de um modelo de obesidade induzido por dieta
em fên	n eas 54
4.4.	A dietahiperlipídica associada ao leite condensado ou frutose induz
obes	idade em fêmeas C57BL/6
4.5.	As dietas hipercalóricas induziram intolerância à glicose e resistência
à ins	ulina em fêmeas C57BI/6
4.6.	A associação do leite condensado ou frutose à dieta rica em gordura
não a	altera o peso do coração em fêmeas C57BI/6 59
Capítu	lo 3: Papel do miR-22 nas alterações metabólicas e cardiovasculares
induzio	das pela obesidade em fêmeas 60
4.7.	A perda do miR-22 atenua o ganho de peso corpóreo promovido pela
dieta	hipercalórica em fêmeas 61
4.8.	A perda do miR-22 atenua o aumento da adiposidade induzida pela
dieta	hipercalórica em fêmeas
4.9.	A deleção do miR-22 reduz a adipogênese e aumenta a lipólise no TAP
em fé	êmeas obesas
4.10.	A perda do miR-22 previne a dislipidemia promovida pela dieta
hipe	r calórica em fêmeas.

4.11. A perda do miR-22 previne a resistência à insulina in dieta hipercalórica em fêmeas	nduzida pela
4.12. A perda do miR-22 induz hipertrofia cardíaca em fêmea	s 72
4.13. A deleção do miR-22 e a dieta hipercalórica alteram expressão de RNAm no coração das fêmeas	o perfil de 79
4.14. A deleção do miR-22 e a obesidade induzida por dieta r	egulam vias
relacionadas à hipertrofia cardíaca no coração de fêmeas	81
4.15. A deleção do miR-22 e a obesidade induzida por die	ta alteram a
expressão de genes ligados à hipertrofia cardíaca no	coração de
camundongos fêmeas.	85
116 Detensial aplicação alípica	89
4.10. Polencial aplicação clínica	
5. CONCLUSÃO	90
 4.16. Potencial aplicação clínica	

1. INTRODUÇÃO

A incidência de obesidade tem aumentado rapidamente em todo mundo. Dessa forma, diversos estudos têm sido desenvolvidos no intuito de compreender os mecanismos envolvidos nas complicações associadas à obesidade a fim de melhorar a saúde e a qualidade de vida dos obesos.

Além do excesso de tecido adiposo e do aumento do ganho de peso, outras comorbidades estão associada à obesidade, aumentando fatores de risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), que estão intimamente associadas a maior taxa de mortalidade e morbidade nesses indivíduos (HILL; WYATT; PETERS, 2012; KLIL-DRORI; AZOULAY; POLLAK, 2017).

Estudos desenvolvidos nas últimas décadas revelaram a influência das diferenças sexuais em diferentes patologias, dentre as quais se destacam as DCV e metabólicas. No entanto, os mecanismos biológicos responsáveis por mediar os efeitos das diferenças sexuais na fisiopatologia cardiometabólica são complexos e ainda não foram completamente elucidados, em parte devido as pesquisas serem, em sua maioria, realizadas em homens ou roedores machos (REGITZ-ZAGROSEK; KARARIGAS, 2017).

Apesar da prevalência de DCV em mulheres antes da menopausa ser menor do que em homens, as mulheres na menopausa desenvolvem DCV com maior frequência do que homens e são mais suscetíveis a desenvolver obesidade e diabetes (CLEGG; HEVENER; MOREAU; MORSELLI *et al.*, 2017; GARCIA; MULVAGH; MERZ; BURING *et al.*, 2016), sugerindo que o estrógeno protege as mulheres de alterações cardiovasculares e metabólicas.

Diante desse contexto, estudos têm sugerido que a redução dos níveis de estrógeno e da sinalização do receptor de estrógeno α (ERα) são a principal causa do aumento da incidência de DCV e de alterações metabólicas observadas em mulheres na menopausa (GARCIA; MULVAGH; MERZ; BURING *et al.*, 2016; OUYANG; MICHOS; KARAS, 2006; ZAYDUN; TOMIYAMA; HASHIMOTO; ARAI *et al.*, 2006)

Mais recentemente, identificou-se que variações epigenéticas também estão relacionadas à diversas diferenças resultantes do dimorfismo sexual (REGITZ-ZAGROSEK; KARARIGAS, 2017). Dentre esses mecanismos epigenéticos, participam os microRNAs (miRNAs), que são pequenos RNAs envolvidos no controle de vários processos biológicos e patológicos através da inibição de seus RNAm-alvos. Um dos diversos miRNAs caracterizado por ter um importante papel no desenvolvimento das DVC é o miRNA-22 (miR-22) (HUANG; WANG, 2014), o qual possui como alvos diversos transcritos envolvidos no controle das alterações metabólicas e cardiovasculares.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a obesidade induzida pela dieta rica em gordura altera o padrão de expressão de miRNAs no tecido cardíaco de camundongos machos e aumenta a expressão do miR-22 (GUEDES; FRANÇA; LINO; KOYAMA *et al.*, 2016). Além disso, demonstramos que a deleção do miR-22 atenua o ganho de tecido adiposo e previne a dislipidemia induzida pela dieta rica em gordura, além de aumentar o gasto energético de animais induzidos à obesidade (DINIZ; HUANG; LIU; CHEN *et al.*, 2017). Esses dados indicam uma importante contribuição do miR-22 para o desencadeamento de algumas alterações metabólicas observadas na obesidade. No entanto, a deleção do miR-22 não altera o remodelamento cardíaco induzido pela obesidade em machos (DINIZ; HUANG; LIU; CHEN *et al.*, 2017).

Considerando que a expressão do miR-22 é regulado pelo dimorfismo sexual (SCHWEISGUT; SCHUTT; WÜST; WIETELMANN *et al.*, 2017), e que este tem como alvos genes que têm efeitos protetores contra disfunções cardiovasculares e metabólicas, é possível que a perda do miR-22 influencie, ao menos em parte, as alterações cardiovasculares e metabólicas induzidas pela obesidade.

Neste sentido, neste estudo caracterizamos possíveis mecanismos mediados pelo miR-22 que poderiam contribuir com as alterações cardiovasculares e metabólicas induzidas por dieta hipercalórica, utilizando camundongos fêmeas knockout (KO) para este miRNA, visando contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para atenuar as complicações cardiovasculares e metabólicas promovidas pela obesidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Impacto da obesidade na saúde

A obesidade é um processo patológico crônico não transmissível, caracterizado pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo no organismo, que resulta em um número elevado de complicações que prejudicam a saúde e a qualidade de vida do indivíduo (MAHAJAN; LAU; SANDERS, 2015), reduzindo até 20 anos da expectativa de vida (BLÜHER, 2019).

A principal causa da obesidade se deve a um desbalanço energético, no qual a quantidade de calorias consumidas é maior que a quantidade de calorias gastas. No entanto, o desenvolvimento da obesidade envolve uma complexa interação multifatorial, uma vez que vários fatores ambientais, genéticos e hormonais estão diretamente implicados no aumento do ganho do peso. Além da predisposição genética, a fácil disponibilidade de alimentos palatáveis com baixo custo e ricos em calorias, associado ao sedentarismo devido à redução da atividade física, contribuem para o cenário obesogênico (EL-SAYED MOUSTAFA; FROGUEL, 2013; KAILA; RAMAN, 2008).

A prevalência da obesidade na população mundial aumentou drasticamente tornando-se crítica no cenário que envolve a saúde pública, sendo eminente tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, atingindo níveis alarmantes (OLIVEIRA; FERRARI; ARAÚJO; MATSUDO, 2017). Nos últimos 20 anos a incidência de obesidade dobrou em adultos e crianças, e triplicou entre os adolescentes (FORD; MAYNARD; LI, 2014). Dados de 2016 demonstraram mais de 1,9 bilhões de pessoas acima do peso, o que corresponde a cerca de 39% da população mundial. Destes, 60 milhões eram obesos (WHO, 2020).

No Brasil, políticas públicas de prevenção e tratamento da obesidade têm sido discutidas e revisadas pelo Ministério da Saúde (DIAS; HENRIQUES; ANJOS; BURLANDY, 2017) devido ao aumento de indivíduos com sobrepeso e obesidade na última década. De acordo com a pesquisa Vigitel (2018), a prevalência da obesidade no Brasil cresceu mais de 67% nos últimos treze anos. Além disso, foi registrado um aumento considerável de 30% no número de brasileiros com excesso de peso (VIGITEL, 2018).

No mapa, identificamos a proporção de indivíduos adultos obesos em todo o mundo. Como esperado, os países desenvolvidos e subdesenvolvidos apresentam uma maior taxa de obesidade sinalizados por um tom azul mais escuro, sendo que só no Brasil, mais de 22% da população é obesa (Figura 1).



Figura 1. Proporção de adultos obesos no mundo. Taxa de obesos em cada país considerando o escore de 0% (branco) sem obesos, e >40% (azul escuro) porcentagem máxima de obesos. Imagem obtida do "Our World in Data" (https://ourworldindata.org/obesity) com base nos dados de 2016 disponibilizados pelo World Health Organization – WHO.

Nesse sentido, é cada vez maior a preocupação dos governos e da sociedade sobre as doenças relacionadas à obesidade, não somente devido ao aumento de sua prevalência, mas também devido ao impacto sobre a qualidade de vida da população e aos altos custos despendidos pelos sistemas de saúde para o tratamento das patologias associadas à obesidade.

Há um grande desafio no que tange a obesidade à respeito da saúde, uma vez que esta encontra-se associada à diversos distúrbios fisiopatológicos, resultado do sobrepeso, aumentando o risco de desenvolver diabetes mellitus do tipo 2, alguns tipos de câncer, doença hepática não alcoólica e DCV (ABDULLAH; PEETERS; DE COURTEN; STOELWINDER, 2010; AVELAR; CLOWARD;

27

WALKER; FARNEY *et al.*, 2007; BRITTON; MASSARO; MURABITO; KREGER *et al.*, 2013; FABBRINI; SULLIVAN; KLEIN, 2010).

2.2. Obesidade e doenças cardiovasculares

As DCV continuam sendo a principal causa de morte no mundo (COLLINS; TOMPSON; ONAKPOYA; ROBERTS *et al.*, 2017). Somente em 2016, mais de 17 milhões de pessoas morreram devido a DCV, o que representa 31% de todas as mortes no mundo (WHO, 2017), sendo que mais de 28% da população brasileira em 2017 morreu em função de alguma doença cardíaca (IHME, 2017).

O coração é um músculo composto por cardiomiócitos, matriz extracelular e uma porção de não miócitos composta por fibroblastos, células endoteliais, células do músculo liso vascular e macrófagos (NAG, 1980). Embora os cardiomiócitos sejam somente um terço das células presentes no coração, eles representam cerca de 80% da massa cardíaca, que compõe a porção muscular, e são extremamente importantes para a manutenção da função cardíaca, uma vez que são os responsáveis por gerar força contrátil a partir dos sarcômeros. (WOODCOCK; MATKOVICH, 2005).

Neste sentido, o coração desempenha sua função de bomba, mantendo a perfusão corpórea para todos os órgãos periféricos. No entanto, em resposta ao estresse, o coração passa por um processo de crescimento denominado "hipertrofia" (NAKAMURA; SADOSHIMA, 2018).

A hipertrofia cardíaca é um mecanismo compensatório ou adaptativo que ocorre no intuito de diminuir o estresse da parede ventricular para preservar a função cardíaca, mas que a longo prazo pode se descompensar e trazer prejuízos para a função cardíaca, predispondo o coração à morte celular, eventos arrítmicos e aumento da deposição de fibrose (IISMAA; GRAHAM, 2003; MAILLET; VAN BERLO; MOLKENTIN, 2013). Neste sentido, alguns estudos da literatura classificam a hipertrofia cardíaca como fisiológica ou patológica.

A hipertrofia compensada, também descrita como hipertrofia fisiológica, é caracterizada por um aumento de até 20% da massa total cardíaca e crescimento dos cardiomiócitos, com função contrátil preservada ou até aumentada, sem morte

celular e, portanto, sem acúmulo de tecido fibrótico (BERNARDO; WEEKS; PRETORIUS; MCMULLEN, 2010). Neste caso, a hipertrofia compensada pode ser reversível e é comum em atletas ou durante a gravidez (MALHOTRA; SHARMA, 2017; PIEPER; WALKER, 2013).

Em contraste, a hipertrofia passa a ser descompensada, ou patológica, quando ocorre alteração da estrutura sarcomérica e dos níveis de cálcio intracelular, levando a uma série de reprogramações metabólicas com reativação da expressão de genes fetais. Paralelamente, observa-se morte dos cardiomiócitos e, portanto, aumento da deposição de tecido fibrótico, culminando em redução da função cardíaca, que pode evoluir para disfunções crônicas como insuficiência cardíaca e morte precoce (NAKAMURA; SADOSHIMA, 2018).

Tanto a hipertrofia cardíaca compensada quanto a descompensada, ocorrem em função do aumento dos cardiomiócitos. Na hipertrofia concêntrica, existe um aumento na espessura da parede, septo e massa cardíaca, e em alguns casos, observa-se redução do volume da câmara cardíaca ventricular esquerda, em função de um aumento na largura dos cardiomiócitos devido a deposição dos sarcômeros em paralelo. Já na hipertrofia excêntrica, há um aumento da massa cardíaca com uma dilatação no volume da câmara cardíaca do ventrículo esquerdo, com aumento no comprimento dos cardiomiócitos devido a deposição sarcomérica em série (BERNARDO; WEEKS; PRETORIUS; MCMULLEN, 2010; MAILLET; VAN BERLO; MOLKENTIN, 2013).

As DCV englobam diversas condições patológicas, como por exemplo disfunções vasculares, hipertensão e insuficiência cardíaca, as quais contribuem para o processo de hipertrofia cardíaca (THAM; BERNARDO; OOI; WEEKS *et al.*, 2015). Sendo que a obesidade é um dos diversos eventos que contribuem para o desenvolvimento das DCV (CASTRO; KOLKA; KIM; BERGMAN, 2014; DOUKETIS; SHARMA, 2005).

A obesidade pode levar há uma série de eventos como hipertensão, lipotoxicidade tecidual, aumento da produção e secreção de citocinas próinflamatórias liberadas pelo tecido adiposo que podem contribuir para o aumento do estresse oxidativo e da resistência à insulina, que são fatores que contribuem para diversas disfunções cardiovasculares (HA; BAUER, 2018).

Neste sentido, várias mudanças estruturais e funcionais são observadas no coração de indivíduos obesos. O remodelamento cardíaco que ocorre na obesidade é caracterizado por aumento na deposição de colágeno na matriz extracelular, que leva à fibrose, além da hipertrofia dos cardiomiócitos, os quais podem resultar em hipertrofia ventricular, comprometimento da função sistólica, disfunção diastólica, podendo progredir à insuficiência cardíaca (ABEL; LITWIN; SWEENEY, 2008; DIWAN; DORN, 2007).

2.3. Dimorfismo sexual no fenótipo cardiometabólico

Além da obesidade, outros fatores como idade, fatores ambientais, hormônios e sexo também contribuem para o fenótipo cardiovascular observado ao longo do tempo (VIRANI; ALONSO; BENJAMIN; BITTENCOURT *et al.*, 2020). Diversos estudos revelaram que o dimorfismo sexual influencia o desenvolvimento das DCV e metabólicas, no entanto, os mecanismos biológicos responsáveis por mediar tais efeitos são ainda pouco conhecidos (COLAFELLA; DENTON, 2018).

Alguns estudos revelaram que mitocôndrias de camundongos fêmeas produzem menos espécies reativas de oxigênio do que machos, resultando em cardioproteção nas fêmeas (BENDALE; KARPE; CHHABRA; SHETE *et al.*, 2013; BORRAS; GAMBINI; VINA, 2007; LAGRANHA; DESCHAMPS; APONTE; STEENBERGEN *et al.*, 2010). Além disso, o estrógeno reduz a deposição de colágeno no coração induzida pela sobrecarga de pressão em fêmeas, quando comparado aos machos, sugerindo que o estrógeno diminui o remodelamento cardíaco patológico (FLIEGNER; SCHUBERT; PENKALLA; WITT *et al.*, 2010).

Variações na expressão gênica específicas do cromossomo X ou Y e nos níveis hormonais estão diretamente envolvidos com as diferenças biológicas observadas entre os sexos (ARNOLD, 2017). Na distribuição da gordura corporal, por exemplo, os homens tendem a depositar gordura principalmente na região visceral, enquanto nas mulheres esse acúmulo de tecido adiposo é tipicamente maior nos depósitos subcutâneos, no entanto, em mulheres após a menopausa as áreas de tecido adiposo visceral são maiores (MOREIRA-PAIS; FERREIRA; NEVES; VITORINO *et al.*, 2020). Tanto o aumento da massa gorda quanto o aumento da gordura visceral contribuem fortemente para o desenvolvimento de diversas disfunções metabólicas e cardiovasculares, enquanto o tecido adiposo subcutâneo já foi associado há um melhor perfil metabólico (IBRAHIM, 2010).

Ainda, foi demonstrado que o estrógeno protege contra o aumento da adiposidade através principalmente de seus efeitos na inibição do apetite e no aumento do gasto energético em fêmeas (PALMER; CLEGG, 2015). De maneira similar, o estrógeno regula a homeostase energética através da modulação do metabolismo de glicose e gordura, promovendo aumento da captação de glicose no músculo esquelético induzida pela insulina e melhora do metabolismo lipídico no fígado (MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013).

No entanto, as DCV ocorrem de maneira mais precoce e mais severa em mulheres obesas (WILSON; D'AGOSTINO; SULLIVAN; PARISE *et al.*, 2002), dado extremamente preocupante, uma vez que a prevalência de obesidade aumentou significativamente nos últimos anos.

Embora os mecanismos pelos quais a obesidade inibe a proteção cardiometabólica em mulheres ainda não sejam bem compreendidos, um dos mecanismos propostos são os miRNAs (IACOMINO; SIANI, 2017; WEHBE; NASSER; PINTUS; BADRAN *et al.*, 2019).

2.4. miRNAs

Por muito tempo, as regiões intrônicas do genoma foram consideradas sem função, uma vez que não codificavam diretamente proteínas. Embora a maior parte do genoma não codifique nenhuma proteína, o desenvolvimento de novas tecnologias possibilitou verificar que a maioria dos nucleotídeos da porção não codificadora são transcritos e podem exercer funções (KOPP; MENDELL, 2018).

Diversos estudos publicados recentemente têm demonstrado o papel de RNAs não codificantes (ncRNAs) atuando diretamente na expressão de diversos genes (BARTEL, 2009; CECH; STEITZ, 2014). Os miRNAs são pequenos RNAs endógenos de até 25 nucleotídeos, que fazem parte da família de ncRNAs, e surgiram como reguladores cruciais da expressão gênica (BARTEL, 2004; 2009) através da inibição da tradução ou da redução da estabilidade dos RNAm alvos, degradando-os (AMBROS, 2004; LAGOS-QUINTANA; RAUHUT; LENDECKEL; TUSCHL, 2001).

A descoberta dos miRNAs levantou diversas questões a respeito do seu funcionamento na célula. A chave para compreender a função dos miRNAs foi encontrar seus genes-alvos a partir do emparelhamento na região 3'UTR do gene com a sequência seed da região 5' do miRNA (KREK; GRÜN; POY; WOLF *et al.*, 2005; WIGHTMAN; HA; RUVKUN, 1993).

A localização dos microRNAs no genoma pode ser categorizado de três principais formas. Eles podem ser classificados como intergênicos, quando são encontrados em diferentes unidades de transcrição nas regiões do genoma, onde podem ser classificados como monocistrônicos (quando possuem seus próprios promotores) ou policistrônicos (quando vários miRNAs compartilham um mesmo promotor, mas são transcritos como um cluster de transcrito primário). Os miRNAs podem ainda ser classificados como intrônicos quando são encontrados na região intrônica de genes codificadores e não codificadores de proteínas, podendo ser único ou um agrupamento de vários microRNAs. Além disso, os miRNAs intrônicos podem ser classificados como mirtrons, quando o íntron é a sequência exata do pré-microRNA com locais de splicing nas suas regiões. E por fim, os microRNAs podem ser exônicos quando seu transcrito se sobrepõe a um exon e íntron de um gene não codificador (OLENA; PATTON, 2010).

A biogênese de um miRNA (Figura 2) inicia a partir da sua transcrição no genoma pela RNA polimerase II (BORCHERT; LANIER; DAVIDSON, 2006) em um transcrito primário de miRNA (pri-miRNA) em forma de grampo. Em seguida, o primiRNA é clivado pela endonuclease Drosha (RNAse III), ficando com uma sequência de 60 a 70 nucleotídeos de comprimento, sendo agora chamado de miRNA precursor (pre-miRNA). Após este processo, o pre-miRNA é transportado do núcleo para o citoplasma pela Exportina-5, onde é então processado em dupla fita de miRNA (dsRNA) (KATAHIRA; YONEDA, 2011), com aproximadamente 20 a 25 nucleotídeos de comprimento. As fitas complementares do dsRNA são então separadas por ação da proteína argonauta (AGO); uma das fitas do dsRNA, chamada de fita guia, é carreada na proteína AGO para incorporar o complexo silenciador induzido por RNA (RISC), enquanto a outra fita, chamada fita passageira, é degradada ou pode exercer ação na própria célula ou em outras células, se exportada para o meio extracelular. De forma geral, este complexo RISC atua como um guia para os miRNAs parearem com seus mRNAs alvo, principalmente na região 3' não-traduzida (3'UTR), induzindo repressão da tradução, clivagem e deadenilação do RNAm. Estudos recentes demonstraram que o complexo RISC também pode interagir com a região 5' não-traduzida (5'UTR) de seus transcritos alvo (BARTEL, 2018; SUZUKI; MIYAZONO, 2011).



Figura 2. Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs (DINIZ; WANG, 2016).

Os miRNAs controlam vários processos biológicos, como proliferação, diferenciação, crescimento e morte celular, entretanto, seu papel também tem sido atribuído a diversas patologias. Nesse sentido, estudos recentes revelaram que os miRNAs estão envolvidos no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca e de DCV,

principalmente devido aos seus efeitos em transcritos envolvidos em vias que regulam a apoptose, senescência celular, proliferação e crescimento celular (MISHRA; TYAGI; KUMAR; TYAGI, 2009; OLIVEIRA-CARVALHO; CARVALHO; SILVA; GUIMARÃES *et al.*, 2012; VAN ROOIJ; SUTHERLAND; QI; RICHARDSON *et al.*, 2007; WILLIAMS; LIU; VAN ROOIJ; OLSON, 2009).

Apesar de inúmeros trabalhos terem caracterizado o papel dos miRNAs em diferentes modelos de DCV, pouco ainda se sabe a respeito do efeito das diferenças sexuais na regulação dos miRNAs, bem como suas implicações no desenvolvimento das DCV (SHARMA; EGHBALI, 2014). Nesse sentido, um estudo demonstrou, através de resultados de microarrays em camundongos e humanos, que o papel dos miRNAs nas DCV pode variar de acordo com o sexo, de forma que o padrão de expressão de RNAm e miRNAs é influenciado pelo dimorfismo sexual (TSUJI; KAWASAKI; MATSUDA; ARAI et al., 2017). Entretanto, as possíveis implicações fisiológicas e patológicas para o sistema cardiovascular dessas diferenças sexuais observadas são desconhecidas. Ainda, recentemente identificou-se que o estrógeno promove remodelamento vascular e cardíaco alterando a expressão de diversos miRNAs em células endoteliais, células musculares lisas vasculares e cardiomiócitos, indicando que os miRNAs podem estar envolvidos, ao menos em parte, nos efeitos desencadeados pelo dimorfismo sexual no sistema cardiovascular (FLORIJN; BIJKERK; VAN DER VEER; VAN ZONNEVELD, 2018).

Outro estudo recente demonstrou que camundongos machos e fêmeas com cardiomiopatia dilatada apresentam aumento da expressão do miR-34a no coração. No entanto, a inibição do miR-34a promoveu maior cardioproteção em camundongos fêmeas do que em machos, evidenciada através da redução da hipertrofia cardíaca e melhora da função cardíaca (Bernardo et al., 2016), sugerindo que diferenças sexuais podem também interferir na eficácia terapêutica.

2.5. miR-22

Dentre os diversos miRNAs caracterizados, destaca-se o miR-22, que pertence a uma família de microRNA de único membro, localizado no cromossomo 17, braço curto 13 (17p13), dentro do éxon 2 da unidade de transcrição de seu gene

hospedeiro não codificante longo, que reside numa região intergênica entre dois codificadores de proteína, TLCD2 e WDR81 (HUANG; CHEN; SEOK; ZHANG *et al.*, 2013; XIONG, 2012).

O miR-22 foi relatado pela primeira vez em 2001 (LAGOS-QUINTANA; RAUHUT; LENDECKEL; TUSCHL, 2001) em diferentes vertebrados e tecidos humanos, principalmente no coração, músculo estriado esquelético e tecido adiposo e, desde então, diversos estudos avaliaram a expressão desse miRNA em vários tecidos e em diferentes condições fisiopatológicas.

O miR-22 atua como um importante regulador da função cardiovascular, como supressor de tumor e também no processo de senescência celular (HUANG; WANG, 2018). Huang e colaboradores demonstraram que o miR-22 influencia a hipertrofia cardíaca, uma vez que a perda de função do miR-22 preveniu o desenvolvimento da hipertrofia e o remodelamento cardíaco em resposta à sobrecarga de pressão (Huang et al. 2013). Outro estudo revelou que o aumento da expressão do miR-22 promove hipertrofia cardíaca, disfunção contrátil e falência cardíaca (Gurha et al., 2013), sugerindo que o miR-22 é um importante fator envolvido no controle da morfologia e função cardíaca. Recentemente identificouse que o miR-22 regula o fenótipo da célula muscular lisa vascular e que o aumento da expressão do miR-22 em artérias femorais submetidas à lesão reduz a proliferação celular e inibe a formação de neoíntima, indicando que o miR-22 pode ser um alvo promissor para o tratamento de DCV (YANG; CHEN; HE; YANG *et al.*, 2018).

O miR-22 possui diversos transcritos alvos envolvidos no controle das alterações metabólicas e cardiovasculares, dentre os quais podemos destacar o ERα e a Sirtuina 1 (Sirt 1) (HUANG; CHEN; SEOK; ZHANG *et al.*, 2013; SCHWEISGUT; SCHUTT; WÜST; WIETELMANN *et al.*, 2017).

Um recente trabalho demonstrou que o ERα é responsável por mediar o efeito do miR-22 na regulação de vias metabólicas no músculo esquelético (SCHWEISGUT; SCHUTT; WÜST; WIETELMANN *et al.*, 2017). Camundongos machos apresentam maior expressão do miR-22 no músculo esquelético em relação às fêmeas, permitindo uma regulação no metabolismo específica ao sexo

devido à inibição do processamento do pri-miR-22 em miR-22 pelo ERα nas fêmeas. Ainda, camundongos machos KO para o miR-22 têm aumento da expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios no músculo esquelético e redução do peso corpóreo, através do aumento do ERα (SCHWEISGUT; SCHUTT; WÜST; WIETELMANN *et al.*, 2017), sugerindo que essa regulação entre o ERα e miR-22 contribui para o efeito do dimorfismo sexual nos genes envolvidos no metabolismo de lipídeos no músculo esquelético de machos.

Outro estudo desenvolvido por Wang e colaboradores (2015) mostrou a participação do estrógeno como protetor a nível celular, reduzindo os danos promovidos pela hipóxia em cardiomiócitos. Neste estudo foi identificado que o estrógeno, através do ERα, reduz de maneira dose dependente a expressão do miR-22 em culturas de cardiomiócitos, sugerindo uma regulação recíproca entre o ERα e o miR-22 nestas células, a qual pode ser crucial para o controle da sensibilidade do coração à sinalização do estrógeno (WANG; TANG; ZHAO; CONG *et al.*, 2015). Entretanto, o possível efeito da deleção do miR-22 em camundongos fêmeas induzidas à obesidade, e as suas implicações cardiovasculares e metabólicas são completamente desconhecidas.

O miR-22 também possui como alvo a Sirt1, uma deacetilase que regula a transcrição de genes envolvidos no metabolismo de glicose e lipídeos (HUANG; WANG, 2014). Banks e Bordone demonstraram que o aumento da expressão da Sirt1 foi capaz de reduzir a adiposidade, intolerância à glicose e resistência à insulina promovida pela obesidade em camundongos (BANKS; KON; KNIGHT; MATSUMOTO *et al.*, 2008; BORDONE; COHEN; ROBINSON; MOTTA *et al.*, 2007). Além disso, um trabalho recente mostrou que o tratamento com Sildenafil, inibidor da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), por 12 semanas reduziu a circunferência abdominal em pacientes diabéticos, a qual foi acompanhada da redução da expressão do miR-22 e do aumento de Sirt1 no tecido adiposo (FIORE; GIANFRILLI; GIANNETTA; GALEA *et al.*, 2016).

Neste sentido, avaliamos neste estudo o papel do miR-22 no ganho de peso corpóreo induzido pela dieta hipercalórica em camundongos fêmeas. Além disso,
buscamos caracterizar a contribuição do miR-22 no desenvolvimento da intolerância à glicose e resistência à insulina induzida pela obesidade, bem como nos níveis de triglicérides e colesterol total. Ainda, avaliamos o efeito do miR-22 e da dieta hipercalórica sobre a pressão arterial e frequência cardíaca, e também caracterizamos a morfologia e função cardíaca de camundongos fêmeas. Por fim, investigamos o impacto do miR-22 e da dieta no remodelamento cardíaco e no padrão de expressão de mRNAs no coração de camundongos fêmeas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Inicialmente, camundongos fêmeas WT e KO para o miR-22 foram randomizadas a partir da 6^a semana vida para o início do tratamento com duas dietas: dieta hiperlipídica para indução da obesidade ou dieta controle, durante 14 semanas de tratamento. O ganho de peso corpóreo foi avaliado semanalmente durante o tratamento com as dietas e duas semanas antes do término do tratamento, a análise de iGTT e ressonância magnética foram realizadas nos grupos. Ao término das 14 semanas de tratamento, foi realizada a eutanásia das fêmeas para obtenção das amostras de tecido adiposo e coração, conforme observado no delineamento experimental da figura 3.



Figura 3. Delineamento experimental do estudo realizado no Capítulo 1.

No entanto, ao término do tratamento, observamos que o tratamento com dieta hiperlipídica não foi capaz de induzir obesidade nas fêmeas WT. Neste sentido, iniciamos um ensaio piloto para validar uma dieta eficaz para indução da obesidade. Para isso, camundongos fêmeas C57BL/6 foram tratadas a partir da 6^a semana de vida com três dietas: dieta hiperlipídica associada ao leite condensado (LC) ou dieta hiperlipídica associada à frutose (F) para indução da obesidade, ou dieta controle durante 14 semanas. O ganho de peso corpóreo foi avaliado semanalmente durante o tratamento com as dietas e duas semanas antes do término do tratamento, a análise de iGTT e ressonância magnética foram realizadas nos grupos. Ao término das 14 semanas de tratamento, foi realizada a eutanásia das fêmeas para obtenção das amostras de tecido adiposo, coração e fígado, conforme observado no delineamento experimental da figura 4.



Figura 4. Delineamento experimental do estudo realizado no Capítulo 2.

Por fim, a dieta hiperlipídica associada ao leite condensado (dieta hipercalórica) foi a escolha para nosso modelo de indução à obesidade. Neste sentido, camundongos fêmeas WT e KO para o miR-22 foram randomizadas a partir da 6^a semana vida para o início do tratamento com dieta hipercalórica para indução da obesidade ou dieta controle, durante 18 semanas. O ganho de peso corpóreo foi avaliado semanalmente durante o tratamento com as dietas e, duas semanas antes do término do tratamento foram realizadas as análises de iGTT, ITT, pletismografia, ecocardiograma e ressonância magnética. Ao término das 18 semanas de tratamento, foi realizada a eutanásia das fêmeas para obtenção do sangue e das amostras de tecido adiposo, coração, fígado e músculo. Posteriormente, a porção plasmática foi obtida para realizar as análises bioquímicas. As proteínas do tecido adiposo e músculo foram extraídas para as análises de western blot e atividades enzimáticas. O RNA extraído do coração foi utilizado para as análises de sequenciamento e qPCR, conforme observado no delineamento experimental da figura 5.



Figura 5. Delineamento experimental do estudo realizado no Capítulo 3.

3.2. Cuidados éticos

Os experimentos foram realizados de acordo com a lei que regulamenta o uso de animais em experimentação científica e de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo-USP sob número de Protocolo 66/2016/CEUA.

3.3. Animais da pesquisa

Para a realização do estudo, foram utilizadas camundongos fêmeas wild type (WT) e knockout (KO) para o miR-22, obtidas a partir do cruzamento de camundongos heterozigotos, os quais foram doados pelo Prof. Da-Zhi Wang da Harvard Medical School. As fêmeas WT foram utilizadas como controle das fêmeas KO para o miR-22. Além disso, camundongas C57black/6 de 6 semanas de idade foram obtidas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) para estudo piloto a fim de estabelecer um modelo eficiente de obesidade induzido por dieta em fêmeas. Os animais foram acondicionados no Biotério do Departamento de Anatomia do ICB USP em gaiolas coletivas, contendo um número máximo de 5 animais por gaiola, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas (6h da manhã até 18h da tarde), em temperatura ambiente constante de 22°C e com suprimento de água e alimento à vontade.

3.4. Tratamento e dieta

Neste projeto foram utilizados três modelos de dieta para estabelecer o modelo de indução de obesidade mais adequado. O primeiro modelo consiste na utilização de uma dieta hiperlipídica e uma dieta controle (Pragsoluções®) (Tabela 1). O segundo modelo consiste na associação da dieta hiperlipídica à 17,5% de xarope de milho (Karo®) na água de beber (AROOR; HABIBI; KANDIKATTU; GARRO-KACHER *et al.*, 2017). E o terceiro modelo na associação da dieta hiperlipídica ao leite condensado (Nestlé®), (NIVOIT; MORENS; VAN ASSCHE; JANSEN *et al.*, 2009), que foi administrada em bebedouros para pássaros (Mr. Pet®), que eram colocados em pares dentro das caixas dos animais. Tanto o leite condensado quanto a frutose eram trocadas 3 vezes na semana para evitar a proliferação de fungos e bactérias.

	Dieta controle	Dieta hiperlipídica		
	% caloria	% caloria		
Carboidrato	70	20		
Proteína	20	20		
Gordura	10	60		
Kcal/g de ração	3,85	5,24		

Tabela 1: Conteúdo calórico das dietas controle e hiperlipídica

A partir dos resultados obtidos pelo nosso estudo piloto, o modelo escolhido para indução de obesidade foi a associação da dieta hiperlipídica ao leite condensado (dieta hipercalórica). Para garantir que eventuais alterações observadas no estudo não fossem devido a uma carência nutritiva, adicionamos 3,5% de mix de micronutrientes AIN93G ao leite condensado (SAMUELSSON; MATTHEWS; ARGENTON; CHRISTIE *et al.*, 2008). Na 6^a semana de vida, as fêmeas foram aleatoriamente divididas em grupos para tratamento com as dietas citadas acima, durante 14 semanas (descritos nos capítulos 1 e 2) ou 18 semanas (descrito no capítulo 3). O acompanhamento do ganho de peso corpóreo foi realizado uma vez por semana no período da manhã, até o final do tratamento.

3.5. Genotipagem

A genotipagem da prole, proveniente do cruzamento de animais heterozigotos para o miR-22, foi realizada na segunda semana de vida para determinação do genótipo: KO, WT ou heterozigoto. Para isso, um pedaço de 2 mm da cauda de cada camundongo foi cortado para realizar o protocolo de extração do DNA, a partir dos reagentes de extração (E7526) e neutralização (N3910), seguindo as recomendações do fabricante (Sigma). As amostras de DNA foram armazenadas à -20°C para futura reação em cadeia da polimerase (PCR).

A PCR foi realizada utilizando a enzima GoTaq® green master mix (Promega) no termociclador Peltier Thermal Cycler (MJ Research) com o programa apresentado na tabela 2, para identificar o genótipo do animal. As sequencias de primers utilizadas foram para WT: 5'-CTT ATT CAA GAA CCC CTC ATT AG-3' e 5'-TTT CCC TCC CAT AAA GCC AT-3' ou KO: 5'- CCT CCC ATT TCT AAC CCT ACAC-3' e 5'-TGT TCG GAT CAG AAG TTC CTA TAC-3'. Para cada amostra, na reação do KO foram utilizados 2 µl de DNA com 1 µl dos primers a 10 µM e para a

reação do WT, 4 µl de DNA com 1 µl dos primers a 20 µM. Após a reação de PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2%, contendo brometo de etídeo, com tampão Tris-acetato EDTA-TAE (40 mM de Tris-acetato e 1 mM de EDTA). A corrida foi realizada numa voltagem de 100 volts durante 30 minutos e o gel foi revelado utilizando o UVITEC Cambrigde (Alliance 9.7) para identificação das bandas correspondentes ao genótipo WT (176pb) ou KO (349pb).

Etapa	Temperatura	Tempo		
1	94°C	3 minutos		
2	94°C	30 segundos		
3	54°C	45 segundos		
4	72°C	1 minuto		
5	Reação do WT: Repete as etapas 2 a 4 por 40 vezes			
5	Reação do KO: Repete as etapas 2 a 4 por 35 vezes			
6	72°C	2 minutos		
7	4°C	-		

Tabela 2: Protocolo utilizado no termociclador para a PCR.

3.6. Análise da composição corpórea por Ressonância Magnética

Duas semanas antes do término com o tratamento das dietas, a composição corporal dos camundongos foi avaliada a partir do aparelho NMR Analyser MQ7.5 no software Minespec Plus NF, onde é possível estimar as porcentagens de massa magra e gorda em relação à massa total do animal, a partir da obtenção dos sinais de radiofrequência, amplitude e a distribuição dos tecidos adiposo e muscular. Neste sentido, os animais eram colocados dentro de um contensor e as leituras foram realizadas no período da tarde, com duração máxima de 3 minutos por animal. Esta análise foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. José Donato Júnior do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/USP.

3.7. Parâmetros hemodinâmicos

Uma semana antes do término do tratamento com as dietas a frequência cardíaca (FC) e a pressão arterial caudal (PAC) foram medidas por pletismografia de cauda no pletismógrafo BP-2000 Blood Pressure Analysis System[™] da Visitech Systems©. Para evitar variações induzidas pelo estresse, as fêmeas foram

previamente aclimatadas durante uma semana antes das medições. As análises foram realizadas no período da manhã com os animais conscientes em um contensor sobre uma placa aquecida à 37°C. Durante a análise, o manguito foi posicionado na cauda do animal sendo coletadas dez medições da PAS e FC por camundongo. Essa análise foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Gerhard Malnic do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/USP.

3.8. Ecocardiograma

Duas semanas antes do término do tratamento com as dietas, as análises ecocardiográficas para avaliação da função e morfologia cardíaca foram realizadas. Os animais foram anestesiados com isoflurano (1,5%) e as imagens foram obtidas usando o Vevo 2100 Visual Sonics a partir do transdutor MicroScan transducer (model MS-550D) 13-24MHz com o Analysis Software 1.3.0 (Build 3338). Os parâmetros da função sistólica e diastólica foram avaliados seguindo o protocolo publicado anteriormente (STOYELL-CONTI; SANTOS; MACHI; HERNANDEZ *et al.*, 2018). Foram avaliados: septo interventricular na diástole (IVSd) e na sístole (IVSs), parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (LVPWd) e na sístole (LVPWs), dimensão interna do ventrículo esquerdo na diástole (LVIDd) e na sístole (LVIDs), fração de ejeção (EF), fração de encurtamento (FS), tempo de relaxamento (IVRT) e contração (IVCT) isovolumétrico e velocidade do relaxamento do ventrículo esquerdo na diástole (LCPWs), dimensão internação (IVCT) isovolumétrico e velocidade do relaxamento do ventrículo esquerdo na diástole (LVIDd) e na sístole (LVIDs), fração de ejeção (EF), fração de encurtamento (FS), tempo de relaxamento (IVRT) e contração (IVCT) isovolumétrico e velocidade do relaxamento do ventrículo esquerdo na diástole inicial/tardia (E/A). As análises foram realizadas no período da tarde, às cegas, em colaboração com a equipe da Prof^a. Dr^a. Maria Cláudia Costa Irigoyen no Instituto do Coração (INCOR).

3.9. Glicemia de jejum

Duas semanas antes do término do tratamento com as dietas, os animais foram submetidos a um período de 12 horas de jejum para avaliação da glicemia de jejum. A glicose foi dosada a partir de uma gota de sangue obtida por um corte de 1 mm feito na cauda do animal e avaliada no glicosímetro (Accu-Check Active).

3.10. Teste de tolerância à glicose e teste de tolerância à insulina

O teste de tolerância à glicose intraperitoneal (iGTT) foi realizado duas semanas precedendo o término do tratamento. Os animais ficaram em jejum durante 12 horas e os níveis glicêmicos foram avaliados antes e após a injeção intraperitoneal de glicose (2g glicose/kg de peso) durante 2 horas. Após 72 horas, o teste de tolerância à insulina (ITT) foi realizado nas fêmeas em jejum por 6 horas. A glicemia foi avaliada antes e após a injeção intraperitoneal de insulina humana Novolin R (0,5 U insulina/kg de peso) durante 1 hora. Em ambos os testes foi utilizando um glicosímetro (Accu-Chek® Active, Roche Diagnostics) para avaliar a glicemia a partir de um corte de 1 mm na cauda do animal. As análises de iGTT (GUEDES; FRANÇA; LINO; KOYAMA et al., 2016) e ITT (OLIVERIO; SCHMIDT; MAUER; BAITZEL et al., 2016) foram baseadas em protocolos previamente descritos. Os resultados foram apresentados através dos gráficos da curva glicêmica e a variação entre os grupos experimentais foi demonstrada em porcentagem. A área sob a curva (AUC) foi calculada para avaliar a intolerância à glicose a partir do GraphPad Prism. A taxa de decaimento da glicose no sangue (kITT) foi calculada para avaliar a sensibilidade à insulina considerando o resultado da inclinação obtido pela análise de regressão linear do ITT (GraphPad Prism), multiplicado por 100, para obter a porcentagem, e normalizado pela glicemia em jejum (FESTUCCIA; BLANCHARD; BELCHIOR; CHIMIN et al., 2014).

3.11. Pesagem dos tecidos

A eutanásia dos animais foi realizada ao término do tratamento com as dietas em câmara de CO₂, seguida do deslocamento cervical. Foram coletados o coração, fígado, músculo gastrocnêmio, tecido adiposo marrom subescapular (TAM) e diferentes territórios do tecido adiposo branco: perigonadal (TAP), retroperitoneal (TAR) e subcutâneo (TAS). Os tecidos foram pesados na balança analítica (Denver Instrument, M-220D) e armazenados no freezer à -80°C. O peso dos órgãos foi normalizado pelo comprimento da tíbia.

3.12. Dosagem bioquímica

Após a eutanásia, o sangue dos animais foi coletado e centrifugado à 3.000 rpm durante 15 minutos à 4ºC para a obtenção do plasma heparinizado. Os

níveis de colesterol total e de triglicérides foram avaliados através do uso de kits comerciais (FUJIFILM Wako Diagnostics) de acordo com as recomendações sugeridas pelo fabricante.

3.13. Análises histológicas

Após a eutanásia, uma secção transversa do coração e uma amostra do TAP foram fixados em paraformaldeído a 10% para processamento histológico. Após desidratação do tecido, as amostras foram incluídas em parafina e cortadas em secções seriadas de 5µm no micrótomo (Leica RM 2145 rotary microtome). As lâminas histológicas do coração foram coradas com aglutinina do germe do trigo (WGA Alexa Fluor 488 conjugate, Invitrogen) para quantificar a área do cardiomiócito no nível do músculo papilar (n=50 cardiomiócitos por coração com limite das células visíveis, n=3-4 corações por grupo). Para avaliar a deposição de colágeno no tecido cardíaco foi utilizada a coloração de Picrosirius Red e a área fibrótica total foi calculada a partir da razão entre a área com marcação de colágeno (coloração vermelha) dividida pela área total do coração (n=3-4 corações por grupo). As lâminas histológicas do TAP foram coradas com hematoxilina e eosina para quantificar o tamanho dos adipócitos (n=40 adipócitos com limite das células visíveis, n=3-4 por grupo). As imagens foram obtidas utilizando um microscópio de luz (Nikon® and software Nis-Elements AR 3.2) e analisadas utilizando o software ImageJ.

3.14. Análise por PCR em tempo real (qPCR)

O RNA total foi isolado do tecido cardíaco utilizando o protocolo do Trizol (LifeTechnologies). A concentração do RNA total foi determinada através da razão das absorbâncias obtidas em λ =260nm e λ =280nm utilizando um leitor de multidetecção (Synergy HT, BioTek®) através do programa para análise de ácidos nucléicos (Gen5 Data Analysis Software, BioTek®). A integridade do RNA foi avaliada em eletroforese em gel de agarose (1.5%) corado com brometo de etídio. Foram consideradas como integras as amostras que apresentaram as duas subunidades de RNA ribossomal (18S e 28S). Para a síntese do cDNA, o RNA foi transcrito reversamente a partir de 1 µg de RNA total (SuperScript II RNase H Reverse Transcriptase, Invitrogen) no termociclador Peltier Thermal Cycler (MJ Research). A PCR foi realizada usando SYBR Green PCR Master Mix (Applied

Biosystems), de acordo com o protocolo do fabricante em termociclador (Corbett Research). Os primers utilizados foram, para 18S: 5'-GCCACTTGTCCCTCT AAGAAGTTG-3' and 5'-GTGCATGGCCGTTCTTAGTTG-3'; para alpha miosina de cadeia pesada (Myh6): 5'-TGACGTCACCTCCAACAT GG-3' and 5'-CCAACTCCC CGTTCTCTGTC-3'; para beta miosina de cadeia pesada (Myh7): 5'-ATTGGTGCC AAGGGCCTGAAT-3' and 5'-GCTTCCACCTAAAGGGCTGTTG-3'; para alfa actina de músculo esquelético (Acta-1): 5'-GCCGGTGAGGATTTTCATCA-3' and 5'-CCTGCCACACGCCATCAT-3'; para colágeno 1 (Col1a): 5'-TTCTCCTGGCAA AGACGGAC-3' and 5'-CGGCCACCATCTTGAGACTT -3'; para colágeno 3 (Col3a): 5'-ACGTAAGCACTGGTGGACAG-3' and 5'-CAGGAGGGCCATAGCTGAAC-3'; para receptor do fator de crescimento epidérmico (Egfr) 5'-CACGCCAACTGTACC TATGGATGT-3' and 5'-GGCCCAGAGGATTTGGAAGAA-3'; para membro da família A homóloga Ras (Rhoa): 5'-CCTTTTGCATTGAACGTGGATT-3' and 5'-ACT TCTCAGATGCAAGGACAA-3'; para receptor beta do fator de crescimento transformador I (Tgfbr1): 5'-CCTCGAGACAGGCCATTTGT' and 5'-CAGCTGACT GCTTTTCTGTAGTT-3'; para calmodulina 1 (Calm1): 5'-CGAGTGTTTGACAAG GATGGG-3' and 5'-ACTTGTCCGTCGCCATCAAT-3'; para proteína de choque térmico 90 da família alfa membro da classe B 1 (Hsp90ab1): 5'-GCTCCTT CGCTATCACACCT-3' and 5'-TTGCTCTTTGCTCTCACCAGT-3'; peptidilprolil isomerase A (Ppia): 5'-AGGATTCATGTGCCAGGGTG' and 5'-GCCATCCAGCCA TTCAGTCT-3'; receptor alfa do hormônio tireoidiano (Thra): 5'-GGCGTTTGAGCA CTACGTCA' and 5'-TGCGGACCCTGAACAACAT-3'; co-ativador gama 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (Pgc1a): 5'-CAAAGA CAACGGACAAATCACC-3' e 5'-CGGGGTCATATGTTTCAACTTG-3'; regulador transcricional associado Yes1 (Yap1): 5'-GTGGAGGCAGTTCCAACCAG' and 5'-ATTCCGTATTGCCTGCCGAA-3'. O 18S foi utilizado como controle endógeno uma vez que sua expressão não foi afetada pela dieta hipercalórica ou pela deleção do miR-22. Para avaliar a expressão do miR-22 no coração, o RNA total isolado das amostras do coração foi transcrito reversamente usando primers específicos de TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems) para o miR-22-3p, miR-22-5p e snoRNA 234. As amostras de cDNA foram amplificadas por qPCR utilizando TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e primers para detecção. Os níveis de expressão relativa de miR-22-3p e miR-22-5p foram normalizados pelos níveis de snoRNA-234, que permaneceram inalterados entre os grupos. Os níveis relativos de expressão foram calculados usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo o ΔCT = Ct do gene de interesse subtraído do Ct do controle interno e o $\Delta\Delta CT$ = ΔCT tratado subtraído do ΔCT controle.

3.15. Western blot

As proteínas do músculo gastrocnêmio e do TAP foram isoladas utilizando o tampão de extração RIPA (Millipore) com inibidores de protease e fosfatase e as concentrações de proteína foram determinadas utilizando um kit de ensaio de proteína BCA (Thermo Fisher) no leitor de multidetecção (Synergy HT, BioTek®). Quarenta µg de proteína por amostra foram avaliadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad). A membrana foi incubada durante 12 horas a 4ºC com anticorpos primários para ALDH2 (1:1.000, # 48837 - Santa Cruz Biotechnology), α-tubulina (1:1.000, # 5286 - Santa Cruz Biotechnology), ATGL (1:1.000, #2138 - Cell Signaling Technology), CEBPa (1:1.000, D-5 # 365318 - Santa Cruz Biotechnology), HSL (1:1.000, #4107 - Cell Signaling Technology), phospho HSL (1:1.000, Ser660, #4107 - Cell Signaling Technology) e UCP1 (1:1.000, # 14670 - Cell Signaling Technology). Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:10.000, Amersham Biosciences) durante 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas e as bandas foram visualizadas no UVITEC Cambrigde (Alliance 9.7) por quimioluminescência utilizando o sistema de detecção de substrato ClarityTM Western ECL (Bio-Rad), seguindo as instruções do fabricante. A coloração com o Ponceau na membrana foi utilizada para normalizar os níveis da proteína ALDH2. Os níveis de proteína foram medidos no software ImageJ e os resultados foram expressos em níveis relativos em relação ao controle.

3.16. Atividade enzimática

A atividade das principais enzimas do metabolismo energético foi analisada no músculo gastrocnêmio dos camundongos. As amostras foram homogeneizadas 1:10 (peso/vol) em Tris-HCI 50 mM, EDTA 1 mM e coquetel de inibidor de protease (pH 7,4). O lisado foi centrifugado a 12000 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante coletado. Todas as atividades enzimáticas foram determinadas a 25°C usando um espectrofotômetro de microplacas Spectra Max 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). As enzimas avaliadas foram: hexoquinase (HK), frutose 6 fosfato desidrogenase (PFK), piruvato quinase (PK), citrato sintase (CS), creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), carnitina palmitoiltransferase (CPT- 1) e β-hidroxiacil CoA desidrogenase (BHADH). O tampão de ensaio sem amostra foi usado como branco. Esses ensaios foram realizados em colaboração com a Prof^a. Dra. Alice Cristina Rodrigues do Departamento de Farmacologia do ICB/USP e a atividade das enzimas foram determinadas conforme descrito anteriormente (ALP; NEWSHOLME; ZAMMIT, 1976; BIEBER; ABRAHAM; HELMRATH, 1972; CARDENAS; DYSON; STRANDHOLM, 1973; CRABTREE; HIGGINS; NEWSHOLME, 1972; HENGARTNER; HARRIS, 1975; LYNEN; WIELAND, 1955; TANZER; GILVARG, 1959).

3.17. Sequenciamento de RNA (RNAseq)

O RNA total foi isolado dos corações utilizando o protocolo do Trizol (Invitrogen). Para a análise de RNAseq foram utilizadas duplicatas para cada grupo experimental. As bibliotecas do sequenciamento foram obtidas utilizando TruSeq® mRNA Library Prep (Illumina®) seguindo as instruções do fabricante. As bibliotecas foram sequenciadas em plataforma Illumina Nextseq de acordo com as instruções do fabricante usando NextSeq 500 High Output Kit (v2.5, 1x75 ciclos). Essas análises foram realizadas em colaboração com o Dr. Pedro Galante e Dra. Paula Asprino do Hospital Sírio Libanês. Os dados de sequenciamento de RNA realizados neste estudo estão depositados publicamente no European Nucleotide Archive (ENA) sob número de acesso PRJEB39970.

3.18. Quantificação da expressão gênica e análises de expressão gênica diferencial

Os níveis de expressão gênica obtidos no RNAseq foram quantificados por Kallisto (BRAY; PIMENTEL; MELSTED; PACHTER, 2016) utilizando o transcriptoma de referência de camundongo GENCODE (versão M24; https://www.gencodegenes.org/). A conversão da expressão do transcrito em expressão gênica foi realizada pelo R package txImport (SONESON; LOVE; ROBINSON, 2015) e genes com expressão superior a 1 contagem nas amostras foram mantidos. A matriz de expressão gênica foi usada como entrada para realizar a análise de expressão diferencial utilizando DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). Todos os genes codificadores de proteínas que apresentaram uma taxa de descoberta falsa (FDR) <0,05 e alteração de dobramento logarítmico (log2FC) <-1 ou >1 nas comparações foram definidos como diferencialmente expressos e usados para as análises. Para representações gráficas desses genes, utilizamos os pacotes R pheatmap (versão 1.0.12) para fazer os heatmaps e ggplot2 (versão 3.3.0) (SHANNON; MARKIEL; OZIER; BALIGA *et al.*, 2003).

3.19. Análise de enriquecimento de vias biológicas

As vias biológicas enriquecidas para genes diferencialmente expressos foram avaliadas utilizando o servidor web Gsea (RAUDVERE; KOLBERG; KUZMIN; ARAK et al., 2019), que incluiu os processos biológicos de Ontologia Genética (GO). O valor de p ajustado <0,05 foi definido como um corte significativo para o enriquecimento. A pontuação de enriquecimento normalizado (NES) foi utilizada para o enriquecimento do conjunto de genes reprimidos ou aumentados. Para essa análise, contamos com a ajuda da Dra. Vanessa Buzatto do Hospital Sírio Libanês e do Dr. Yao Wei Lu da Harvard Medical School. Para identificação dos alvos do miR-22, foi utilizada а plataforma TarguetScan v.7.2 (http://www.targetscan.org/vert_72/). A análise do diagrama de Venn foi realizada utilizando a plataforma Venny v.2.1 (https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/).

3.20. Análise dos dados

Os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média. O software GraphPadPrism (v 8.0) foi utilizado para a realização das análises estatísticas e elaboração dos gráficos. A distribuição dos dados foi avaliada a partir do teste Komogorovi Smirnov. Para comparações entre os grupos controle e tratados com dieta hiperlipídica associado ao leite condensado ou frutose, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) de uma via, e para comparar os múltiplos grupos experimentais (genótipo e dieta), foi empregado a ANOVA de duas vias. Quando a ANOVA apresentou significância estatística, o pós-teste Bonferroni foi aplicado. Dados com valor de p<0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

Capítulo 1: Caracterização do modelo de obesidade em fêmeas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. A dieta rica em gordura não induz obesidade em fêmeas

A fim de investigar o papel do miR-22 nas alterações metabólicas e cardiovasculares promovidas pela obesidade, fêmeas WT e KO para o miR-22 foram tratadas com dieta controle ou hiperlipídica por 14 semanas.

Diferente dos dados prévios do nosso laboratório, nos quais camundongos machos WT tratados com dieta hiperlipídica por 12 semanas demonstraram aumento gradual no ganho de peso em relação aos seus controles (DINIZ; HUANG; LIU; CHEN *et al.*, 2017), aqui observamos que as fêmeas WT tratadas com dieta hiperlipídica foram resistentes ao ganho de peso induzido pela dieta (Figura 6A-B).

Além disso, o peso de diferentes territórios do tecido adiposo branco (TAP e TAR) foi semelhante em ambos os grupos, indicando que a dieta hiperlipídica não foi capaz de aumentar a adiposidade nas fêmeas (Figura 6C-D).

Em conjunto esses resultados sugerem que o controle do peso corpóreo ocorre de maneira sexualmente dimórfica, condizente com dados da literatura que demonstram que fêmeas apresentam maior resistência ao aumento do ganho de peso induzido por dieta em comparação a camundongos machos, sendo o estrógeno responsável por mediar a resistência à obesidade nas fêmeas (STUBBINS; HOLCOMB; HONG; NÚÑEZ, 2012).



Figura 6. A dieta hiperlipídica não foi eficaz em induzir obesidade em fêmeas. (A) Acompanhamento do ganho de peso corpóreo semanal em fêmeas WT e KO para o miR-22 tratadas com dieta controle ou hiperlipídica durante 12 semanas (n= 6-11). (B) Análise do peso corpóreo ao final da 14^a semana de tratamento (n= 6-11). (C) Peso do tecido adiposo branco perigonadal (TAP) e (D) retroperitoneal (TAR) normalizado pelo comprimento da tíbia (n=6-11).

4.2. A dieta hiperlipídica não induziu intolerância à glicose em fêmeas

Para avaliar o efeito da dieta no controle glicêmico, o teste de tolerância à glicose intraperitoneal (iGTT) foi realizado. A glicemia foi dosada em jejum (0) e após a injeção intraperitoneal de glicose em diferentes tempos (Figura 7A).

Apesar das fêmeas do grupo WT e KO para o miR-22 tratadas com dieta hiperlipídica demonstrarem um aumento dos níveis de glicose nos primeiros 30 minutos do teste quando comparadas com seus respectivos controles (Figura 7A), não houve diferença entre os grupos na área sob a curva (Figura 7B), indicando, portanto, que a dieta hiperlipídica também não foi capaz de induzir intolerância à glicose nas fêmeas.

Além disso, a dieta hiperlipídica não foi capaz de aumentar a glicemia em jejum nas fêmeas WT quando comparadas com seu controle (Figura 7C), indicando que as fêmeas tratadas com dieta rica em gordura não desenvolveram hiperglicemia, característica frequentemente observada na obesidade (BOURET; LEVIN; OZANNE, 2015).



Figura 7. A dieta hiperlipídica não promoveu intolerância à glicose em fêmeas. (A) Teste de tolerância à glicose intraperitoneal-iGTT e (B) Área sob a curva em fêmeas WT e KO para o miR-22 tratadas com dieta controle ou hiperlipídica (n= 6-11). (C) Glicemia em jejum. * WT rica em gordura vs WT controle (p<0,05); # WT rica em gordura vs WT controle (p<0,05).

4.3. A dieta hiperlipídica não induziu hipertrofia cardíaca em fêmeas

Considerando o objetivo deste estudo em avaliar o papel do miR-22 nas alterações cardiovasculares induzidas pela obesidade, a razão do peso do coração pelo comprimento da tíbia foi avaliada como parâmetro de hipertrofia cardíaca.

Conforme demonstrado a seguir (Figura 8), a dieta rica em gordura não foi capaz de promover um aumento da massa cardíaca.



Figura 8. A dieta hiperlipídica não promoveu aumento da massa cardíaca em fêmeas. Peso do coração normalizado pelo comprimento da tíbia em fêmeas WT e KO para o miR-22 tratadas com dieta controle ou hiperlipídica (n= 5-10).

Esse conjunto de dados indica claramente que o tratamento de fêmeas WT com a dieta hiperlipídica por 14 semanas não induziu as alterações comumente observadas na obesidade, similares a outros estudos, os quais demonstraram que camundongos fêmeas apresentam maior resistência às alterações metabólicas induzidas por dieta (BENDALE; KARPE; CHHABRA; SHETE *et al.*, 2013) devido principalmente à participação do estrógeno (CLEGG; HEVENER; MOREAU; MORSELLI *et al.*, 2017).

Capítulo 2: Estabelecimento de um modelo de obesidade induzido por dieta em fêmeas

4.4. A dietahiperlipídica associada ao leite condensado ou frutose induz obesidade em fêmeas C57BL/6.

Alguns estudos já demonstraram que fêmeas são mais resistentes ao ganho de peso e às alterações metabólicas induzidas por dieta, devido principalmente ao efeito protetor do estrógeno. Considerando que a dieta hiperlipídica não foi capaz de aumentar o ganho de peso corpóreo e de promover as alterações metabólicas e cardíacas esperadas em camundongos fêmeas WT, testamos então outros modelos de obesidade induzido por dieta em fêmeas com base em trabalhos da literatura (AROOR; HABIBI; KANDIKATTU; GARRO-KACHER *et al.*, 2017; SAMUELSSON; MATTHEWS; ARGENTON; CHRISTIE *et al.*, 2008; STUBBINS; HOLCOMB; HONG; NÚÑEZ, 2012).

A partir disso, iniciamos um protocolo piloto para avaliar a eficiência de dois modelos de indução à obesidade em camundongos fêmeas C57BL/6, administrando dieta hiperlipídica associada ao leite condensado (NIVOIT; MORENS; VAN ASSCHE; JANSEN *et al.*, 2009; SAMUELSSON; MATTHEWS; ARGENTON; CHRISTIE *et al.*, 2008), ou dieta hiperlipídica associada à frutose (17,5%) na água de beber (AROOR; HABIBI; KANDIKATTU; GARRO-KACHER *et al.*, 2017) durante 12 semanas de tratamento.

As fêmeas C57Bl/6 tratadas com ambas dietas hipercalóricas demonstraram um aumento no ganho de peso corpóreo a partir da 7^a semana de tratamento (Figura 9A) e aumento no peso corpóreo ao final do tratamento (Figura 9B) quando comparadas com o grupo que recebeu a dieta controle.

Além disso, a análise da composição corpórea do conteúdo de massa gorda e magra avaliado por ressonância magnética ao final do tratamento revelou que a porcentagem de massa gorda nas fêmeas tratadas com as dietas hipercalóricas foi maior quando comparado com o grupo controle (Figura 9C), enquanto o oposto foi observado na porcentagem de massa magra (Figura 9D).



Figura 9. A dieta hipercalórica promoveu obesidade em camundongos fêmeas. (A) Acompanhamento do ganho de peso corpóreo semanal e (B) peso corpóreo final em fêmeas C57BL/6 tratadas com dieta controle ou hiperlipídica associada ao leite condensado (LC) ou frutose (F) durante 14 semanas (n=5). (C) Análise da composição corpórea por ressonância magnética da massa gorda e (D) massa magra (n=4-5). * vs dieta controle (p<0,05).

De maneira similar, as fêmeas tratadas com as dietas hipercalóricas apresentaram aumento do peso de diferentes territórios do tecido adiposo branco como TAP, TAR e TAS, sem alterar o peso do TAM, quando comparadas às controles (Figura 10A-D). Estes dados indicam uma eficiência dos novos protocolos utilizando dietas hipercalóricas para indução da obesidade em fêmeas.



Figura 10. A dieta hipercalórica promoveu aumento da adiposidade em fêmeas. (A) Peso dos tecidos adiposos branco perigonadal-TAP, (B) retroperitoneal-TAR, (C) subcutâneo-TAS e (D) peso do tecido adiposo marrom-TAM de fêmeas C57BL/6 tratadas com dieta controle ou hiperlipídica associada ao leite condensado (LC) ou frutose (F) durante 12 semanas (n=5). * vs dieta controle (p<0,05).

4.5. As dietas hipercalóricas induziram intolerância à glicose e resistência à insulina em fêmeas C57BI/6

A glicemia das fêmeas tratadas com dieta hipercalórica aumentou significativamente após a injeção de glicose quando comparado às fêmeas do grupo controle na análise do iGTT e área sob a curva (Figura 11A-B).

Além disso, as dietas hipercalóricas comprometeram o decaimento da glicemia após injeção de insulina nas fêmeas C57Bl/6 quando comparado com as fêmeas controles, conforme observado durante o iTT e no cálculo da constante de decaimento da glicose (kITT) (Figura 11C-D).

Ainda, a dieta rica em gordura associada ao leite condensado promoveu um aumento na glicemia de jejum quando comparado com os animais que receberam a dieta controle, observado no tempo 0 da figura 10A. Em conjunto, os resultados obtidos demonstraram que a dieta rica em gordura associada ao leite condensado ou frutose foi capaz de promover intolerância à glicose e resistência à insulina nas fêmeas.



Figura 11. As fêmeas tratadas com dieta hipercalórica desenvolveram intolerância à glicose e resistência à insulina. (A) Teste de tolerância à glicose intraperitoneal-iGTT e (B) área sob a curva. (C) Teste de tolerância à insulina e (D) constante de decaimento da glicose-kITT em fêmeas C57BL/6 tratadas com dieta controle ou hiperlipídica associada ao leite condensado (LC) ou frutose (F) (n=5). * Dieta hiperlipídica associada ao leite condensado vs dieta controle (p<0,05), # Dieta hiperlipídica associada a frutose vs dieta controle (p<0,05), & Dieta hiperlipídica associada ao leite condensado vs frutose (p<0,05).

4.6. A associação do leite condensado ou frutose à dieta rica em gordura não altera o peso do coração em fêmeas C57BI/6

A razão do peso do coração pelo comprimento da tíbia não foi alterada entre os grupos (Tabela 3), indicando que o tratamento durante 14 semanas com a dieta hipercalórica não induziu aumento do peso do coração nas fêmeas. O mesmo foi observado no peso do fígado, que foi similar entre os grupos (Tabela 3).

No geral, nossos dados indicam que estes novos modelos de dieta hipercalórica foram capazes de induzir obesidade e disfunções metabólicas nas fêmeas, observados pelo aumento do ganho de peso, adiposidade, resistência à insulina e intolerância à glicose.

Neste sentido, os tratamentos para as fêmeas do miR-22 foram ajustados para este novo protocolo. Levando em consideração que a associação ao leite condensado foi capaz de modular a glicemia, selecionamos a dieta rica em gordura associada ao leite condensado (hipercalórica) para ser utilizada e, na tentativa de garantir que a obesidade induzida pela dieta fosse capaz de induzir hipertrofia cardíaca neste modelo, ajustamos o protocolo de tratamento com a dieta para 18 semanas de tratamento.

Tabela 3. Característica	as das	fêmeas	C57BL/6	tratadas	com	dieta	controle	ou
hiperlipídica associada a	o leite	condens	sado (LC)	ou frutos	e (F)	após	12 semar	nas
de tratamento.								

Parâmetros	Controle	LC	F	
	(n=4-5)	(n=4-5)	(n=4-5)	
Peso do fígado (g)	$0,95 \pm 0,04$	0,84 ± 0,13	$0,95 \pm 0,04$	
Peso do coração (mg)	129,80 ± 5,10	131,85 ± 3,43	127,75 ± 5,60	
Comprimento da tíbia (mm)	17,55 ± 0,13	$17,42 \pm 0,17$	17,36 ± 0,16	

* vs dieta controle (p<0,05). A tabela demonstra a média ± erro padrão da média entre os grupos.

Capítulo 3: Papel do miR-22 nas alterações metabólicas e cardiovasculares induzidas pela obesidade em fêmeas

4.7. A perda do miR-22 atenua o ganho de peso corpóreo promovido pela dieta hipercalórica em fêmeas

Para investigar o papel do miR-22 nas alterações metabólicas e cardiovasculares promovidas pela obesidade, fêmeas WT e KO para o miR-22 foram tratadas com dieta controle ou hipercalórica durante 18 semanas.

O acompanhamento do peso corpóreo semanal (Figura 12A) demonstrou que as fêmeas WT e KO tratadas com a dieta hipercalórica apresentaram aumento do ganho de peso corpóreo quando comparadas àquelas que receberam a dieta controle, observado também na avaliação do peso corpóreo ao final do tratamento (Figura 12B). Entretanto, as fêmeas KO para o miR-22 que receberam dieta hipercalórica apresentam menor ganho de peso corpóreo em relação às fêmeas WT que receberam a mesma dieta (Figura 12A-B).



Figura 12. A deleção do miR-22 atenua o ganho de peso corpóreo promovido pela dieta hipercalórica em fêmeas. (A) Acompanhamento do ganho de peso corpóreo semanal em fêmeas WT e KO para o miR-22 tratadas com dieta controle ou hipercalórica durante 16 semanas e (B) Análise do peso corpóreo ao final da 18^a semana de tratamento (n= 7-13). *WT dieta hipercalórica vs WT dieta controle (p<0,05), #KO dieta hipercalórica vs KO dieta controle (p<0,05), &KO dieta hipercalórica (p<0,05).

Os resultados obtidos a partir do novo protocolo evidenciaram que as fêmeas WT para o miR-22 tratadas com a dieta hipercalórica demonstraram aumento no ganho de peso corpóreo, indicando que a administração da nova dieta foi capaz de induzir obesidade.

Além disso, demonstramos que a deleção do miR-22 não afeta o ganho de peso corpóreo em fêmeas tratadas com dieta controle. Esses dados são condizentes com um estudo anterior (SCHWEISGUT; SCHUTT; WÜST; WIETELMANN *et al.*, 2017) que mostrou que a inibição do miR-22 em camundongos fêmeas não foi capaz de alterar o peso corpóreo frente ao tratamento com dieta controle. Entretanto, a deleção do miR-22 atenua o aumento do ganho de peso corpóreo induzido pela dieta hipercalórica em camundongos fêmeas. Este padrão não foi demonstrado anteriormente nos machos KO para o miR-22 (DINIZ; HUANG; LIU; CHEN *et al.*, 2017), sugerindo que o miR-22 pode exercer diferentes efeitos no ganho de peso corpóreo induzido pela obesidade de maneira dependente do gênero.

4.8. A perda do miR-22 atenua o aumento da adiposidade induzida pela dieta hipercalórica em fêmeas

Para identificar se a atenuação no ganho de peso corpóreo promovido pela deleção do miR-22 nas fêmeas tratadas com dieta hipercalórica era devido à diminuição da massa adiposa, realizamos a análise da composição corpórea por ressonância magnética.

Descobrimos que as fêmeas WT e KO para o miR-22 tratadas com dieta hipercalórica apresentam aumento na porcentagem de massa gorda quando comparado com seus respectivos controles. Entretanto, essa porcentagem é menor nas fêmeas KO para o miR-22, indicando que a deleção do miR-22 atenua o ganho de massa gorda induzido pela dieta hipercalórica (Figura 13A).

Além disso, as fêmeas tratadas com dieta hipercalórica apresentaram aumento do peso dos tecidos adiposos brancos TAP, TAR e TAS (Figura 13B-D) normalizados pelo comprimento da tíbia quando comparadas com seus respectivos controles. Por sua vez, as fêmeas KO para o miR-22 demonstraram diminuição do ganho de tecido adiposo branco induzido pela dieta hipercalórica (Figura 13B-D).

Aqui, observamos que as fêmeas KO para o miR-22 tratadas com dieta hipercalórica apresentaram uma diminuição na adiposidade, indicando que a deleção do miR-22 atenua o ganho de tecido adiposo branco induzido pela obesidade em fêmeas de maneira similar ao que observamos anteriormente nos

machos com deleção do miR-22, no qual machos KO para o miR-22 desafiados com uma dieta rica em gordura, apresentaram uma atenuação do ganho do tecido adiposo epididimal (DINIZ; HUANG; LIU; CHEN *et al.*, 2017).



Figura 13. A deleção do miR-22 atenua a adiposidade promovida pela dieta hipercalórica em fêmeas. (A) Análise da composição corpórea total por ressonância magnética da porcentagem de massa gorda de fêmeas WT e KO para o miR-22 tratadas com dieta controle ou hipercalórica (n=7-13). (B) Peso dos tecidos adiposos branco perigonadal-TAP, (C) retroperitoneal-TAR e (D) subcutâneo-TAS (n=6-12). *WT dieta hipercalórica vs WT dieta controle (p<0,05), #KO dieta hipercalórica vs KO dieta controle (p<0,05), &KO dieta hipercalórica (p<0,05).

4.9. A deleção do miR-22 reduz a adipogênese e aumenta a lipólise no TAP em fêmeas obesas.

Considerando que as fêmeas KO obesas apresentaram uma atenuação do ganho de tecido adiposo branco promovido pela obesidade, verificamos por histologia a área dos adipócitos no TAP. Aqui, observamos que a dieta hipercalórica promoveu um aumento da área dos adipócitos no TAP quando comparado com as fêmeas que receberam a dieta controle. Entretanto, a deleção do miR-22 atenuou a hipertrofia dos adipócitos promovida pela obesidade (Figura 14A-B).

Para melhor compreender os mecanismos pelos quais o miR-22 regula a expansão do tecido adiposo branco nas fêmeas obesas, investigamos marcadores de adipogênese e lipólise por western blot no TAP de fêmeas WT e KO tratadas com dieta controle ou hipercalórica.

A proteína α de ligação ao intensificador de CCAAT (C/EBP α) é um fator de transcrição crítico do processo de adipogênese, responsável por promover um aumento da expressão de diversos genes responsáveis pela diferenciação dos adipócitos (JIN; ZHANG; YAN; LIU *et al.*, 2010; ROSEN; HSU; WANG; SAKAI *et al.*, 2002). Aqui, demonstramos que a deleção do miR-22 atenuou o aumento da expressão da C/EBP α promovida pela dieta hipercalórica (Figura 14C), sugerindo que a perda do miR-22 parece atenuar o aumento da adipogênese promovido pela obesidade em fêmeas.

Como a lipólise é controlada pela lipase triglicerídica adiposa (ATGL) e lipase sensível ao hormônio (HSL) (YOUNG; ZECHNER, 2013), avaliamos a expressão protéica dessas enzimas no TAP. A expressão da ATGL aumentou no TAP das fêmeas KO para o miR-22 tratadas com dieta hipercalórica (Figura 14D). Além disso, as fêmeas WT obesas apresentaram uma redução na fosforilação da HSL comparadas com as fêmeas WT tratadas com dieta controle (Figura 14E), enquanto a deleção do miR-22 promoveu um aumento da pHSL. Neste sentido, a deleção do miR-22 parece promover um aumento da lipólise no TAP, conforme observado pelo aumento ATGL e HSL, marcadores do processo de degradação dos triglicerídeos.

Em conjunto nossos dados sugerem que em fêmeas, o miR-22 é um fator importante do processo de adipogênese e lipólise do TAP, corroborando com dados prévios do nosso grupo de pesquisa que revelaram que machos obesos KO para o miR-22 apresentaram uma redução na expressão gênica de marcadores envolvidos no processo de adipogênese e lipogênese do tecido adiposo epididimal (DINIZ; HUANG; LIU; CHEN *et al.*, 2017).

Sabendo que os adipócitos beges contribuem para o processo de termogênese, nos perguntamos se a redução da massa de tecido adiposo branco observada nas fêmeas KO para o miR-22 obesas poderia estar acontecendo por meio do escurecimento do tecido adiposo perigonadal. Observamos por western

blot que as fêmeas KO obesas apresentaram uma redução da proteína desacopladora 1 (UCP1) no TAP quando comparado com as fêmeas WT obesas (Figura 14F). Embora não seja estatisticamente significante (p=0,13), observamos uma tendência na redução da expressão protéica de UCP1 no TAP das fêmeas KO controles quando comparado com as fêmeas WT que receberam a mesma dieta. Esse achado sugere que o escurecimento do TAP não está envolvido na redução da adiposidade observada nas fêmeas obesas com deleção do miR-22, uma vez que os níveis protéicos da UCP1 estão reduzidos nas fêmeas KO para o miR-22 tratadas tanto com a dieta controle como com a dieta hipercalórica.

Levando em consideração que o tecido adiposo marrom (TAM) é o principal tecido responsável pela termogênese e que sua atividade está associada à proteção de doenças metabólicas, como a obesidade (VILLARROYA; CEREIJO; VILLARROYA; GIRALT, 2017), avaliamos a morfologia do TAM por histologia (Apêndice 1A) e não identificamos alterações muito evidentes entre os grupos.

Observamos que o peso do TAM ao final do tratamento foi maior nas fêmeas obesas quando comparado com seus respectivos controles tratados com dieta controle (Apêndice 1B). Ainda, observamos uma redução na expressão da UCP1 no TAM por Western blot nas fêmeas KO para o miR-22 quando comparado com as fêmeas WT, ambas alimentadas com a dieta hipercalórica (Apêndice 1C). Em conjunto, nossos dados fornecem evidências de que a melhora metabólica observada nas fêmeas KO para o miR-22, pode possivelmente, não estar associada há maior atividade do TAM.





Α.

Controle

Hipercalórica

C.

(expressão relativa)

C/EBP_α

250

200

150

100

50 0 wт

CEBPa a-tubulina

Controle

Figura 14. A deleção do miR-22 atenua a adipogênese e aumenta a lipólise no tecido adiposo branco. (A) Análise da área dos adipócitos no tecido adiposo perigonadal-TAP por histologia usando a coloração de hematoxilina e eosina e (B) quantificação da área dos adipócitos avaliado pelo ImageJ (n=3-4, barra 100 µm). (C) Western blot do TAP para avaliação dos níveis protéicos da C/EBPα e (D) ATGL normalizados pela α-tubulina, (E) fosforilação da HSL normalizada pelos níveis da HSL total e (F) UCP1 normalizada pela α-tubulina em fêmeas WT e KO para o miR-22 tratadas com dieta controle (C) ou hipercalórica (Hc) durante 18 semanas (n=3-8). *WT dieta hipercalórica vs WT dieta controle (p<0,05), **#**KO dieta hipercalórica vs WT dieta hipercalórica vs WT dieta hipercalórica (p<0,05), **\$**KO dieta controle vs WT dieta controle (p<0,05).

4.10. A perda do miR-22 previne a dislipidemia promovida pela dieta hipercalórica em fêmeas.

Para avaliar o perfil lipídico das fêmeas, avaliamos os níveis de colesterol total e triglicérides. As fêmeas WT obesas apresentaram aumento dos níveis plasmáticos de triglicérides e colesterol total (Figura 15A-B) quando comparado ao seu respectivo controle. Entretanto, este aumento promovido pela dieta foi totalmente prevenido nas fêmeas KO para o miR-22, demonstrando, portanto, que a deleção do miR-22 previne a dislipidemia causada pela dieta hipercalórica.

De maneira similar aos dados publicados anteriormente por nosso grupo de pesquisa em camundongos machos (DINIZ; HUANG; LIU; CHEN *et al.*, 2017), a deleção do miR-22 protegeu as fêmeas obesas contra a dislipidemia. Em conjunto, esses achados destacam a importância do miR-22 atuando como um regulador chave na dislipidemia induzida por dieta em ambos os sexos.



Figura 15. A deleção do miR-22 previne a dislipidemia induzida pela obesidade em fêmeas. (A) Impacto da dieta nos níveis plasmáticos de triglicérides e (B) colesterol total em fêmeas WT e KO para o miR-22 tratadas com dieta controle ou hipercalórica durante 18 semanas (n=4-7). *WT dieta hipercalórica vs WT dieta controle (p<0,05), #KO dieta hipercalórica vs KO dieta controle (p<0,05), &KO dieta hipercalórica (p<0,05).

Levando em conta que a obesidade é capaz de promover diversas comorbidades, como dislipidemias e doença hepática gordurosa não alcoólica (SARWAR; PIERCE; KOPPE, 2018) e considerando que a deleção do miR-22 preveniu a dislipidemia induzida pela obesidade, avaliamos a morfologia do fígado por histologia nas fêmeas para avaliar o impacto da deleção do miR-22 e da dieta hipercalórica.

O peso do fígado foi maior nas fêmeas WT tratadas com dieta hipercalórica e nas fêmeas KO para o miR-22 tratadas com dieta controle comparadas com as fêmeas WT controles (Apêndice 2A) demonstrando, portanto, que além da obesidade, a deleção *per se* do miR-22 promoveu um aumento no peso do fígado.

Ainda, é possível observar na histologia do tecido hepático corado com hematoxilina e eosina, que as fêmeas WT obesas apresentam vários vacúolos de gordura, e o mesmo pôde ser observado nas fêmeas KO para o miR-22 tratadas com ambas as dietas (Apêndice 2B).

Esses resultados diferem dos observados pelo nosso grupo de pesquisa, onde a deleção do miR-22 não afetou o conteúdo nas gotículas de lipídios e no triglicerídeos hepático em camundongos machos KO (DINIZ; HUANG; LIU; CHEN *et al.*, 2017). Por outro lado, um estudo recente demonstrou que a inibição do miR-22 promoveu um aumento da oxidação de ácidos graxos hepáticos, via FGFR1, atenuando a esteatose hepática promovida pelo tratamento com dieta ocidental em camundongos machos (HU; LIU; JENA; SHENG *et al.*, 2020; WANG; WANG; MUGIYANTO; CHANG *et al.*, 2020).

Em conjunto, nossos dados parecem sugerir que a deleção do miR-22 controla a deposição de gordura no fígado de maneira sexualmente dimórfica. Entretanto, mais investigações são necessárias para determinar o impacto que a deleção do miR-22 exerce em resposta à dieta hipercalórica no fígado das fêmeas.

4.11. A perda do miR-22 previne a resistência à insulina induzida pela dieta hipercalórica em fêmeas

Em seguida, avaliamos o impacto da deleção do miR-22 na intolerância à glicose e resistência à insulina em resposta à obesidade em camundongos fêmeas.

A glicemia das fêmeas WT e KO tratadas com dieta hipercalórica aumentou quando comparado às respectivas controles, tanto na análise de iGTT (Figura 16A) quanto na análise da área sob a curva (Figura 16B) demonstrando, portanto, que a perda do miR-22 não altera a intolerância à glicose promovida pela dieta hipercalórica. Esses resultados são similares aos observados anteriormente em camundongos machos KO para o miR-22 (DINIZ; HUANG; LIU; CHEN *et al.*, 2017).

Além disso, fêmeas WT tratadas com dieta hipercalórica apresentaram menor decaimento da glicemia após injeção de insulina no teste de iTT (Figura 16C), também verificado através da kITT (Figura 16D), quando comparadas com seu respectivo controle, indicando o desenvolvimento de resistência à insulina. Entretanto, este padrão não foi observado nas fêmeas KO para o miR-22 tratadas com dieta hipercalórica, sugerindo que a deleção do miRNA-22 previne a resistência à insulina causada pela dieta hipercalórica em fêmeas.



Figura 16. A deleção do miR-22 previne a resistência à insulina observada na obesidade. (A) Teste de tolerância à glicose intraperitoneal-iGTT e (B) área sob a curva. (C) Teste de tolerância à insulina e (D) constante de decaimento da glicose-kITT em fêmeas WT e KO para o miR-22 tratadas com dieta controle ou hipercalórica (n=4-7). *WT dieta hipercalórica vs WT dieta controle (p<0,05), #KO dieta hipercalórica vs KO dieta controle (p<0,05), &KO dieta hipercalórica vs WT dieta hip

Considerando que o principal tecido alvo em resposta à intolerância à glicose e resistência à insulina é o músculo esquelético, que realiza um papel importante no processo da captação de glicose mediada pela insulina (DEFRONZO; TRIPATHY, 2009), nos perguntamos se o miR-22 poderia atuar no metabolismo do músculo esquelético nas fêmeas.

Na análise da composição corpórea por ressonância magnética, a obesidade reduziu a porcentagem de massa magra nas fêmeas WT quando comparadas com o grupo WT que recebeu a dieta controle (Tabela 4). Entretanto, a porcentagem de massa magra foi maior nas fêmeas KO para o miR-22 quando comparado com as fêmeas WT, ambas tratadas com dieta hipercalórica (Tabela 4).

	Con	trole	Hipercalórica		
Parâmetros	WT	KO miR-22	WT	KO miR-22	
	(n=4-5)	(n=4-5)	(n=4-5)	(n=4-5)	
Massa magra (%)	72,70 ± 0,50	72,78 ± 0,57	54,99 ± 0,96*	61,20 ± 0,79#&	
PK (umol/min*mg)	413,49 ± 18,88	410,74 ± 60,10	455,26 ± 23,90	406,51 ± 19,70	
HK (umol/min*mg)	3,67 ± 1,25	5,58 ± 1,38	$5,78 \pm 0,44$	8,13 ± 1,82	
PFK (umol/min*mg)	85,13 ± 5,57	77,92 ± 6,77	74,67 ± 2,77	72,26 ± 3,94	
CK (umol/min*mg)	50,69 ± 1,96	46,46 ± 4,58	45,51 ± 1,99	51,06 ± 3,96	
CS (umol/min*mg)	107,81 ± 4,10	112,52 ± 14,03	110,86 ± 10,30	120,96 ± 3,66	

Tabela 4. Características do músculo esquelético

*WT dieta hipercalórica vs WT dieta controle (p<0,05), #KO dieta hipercalórica vs KO dieta controle (p<0,05), **&**KO dieta hipercalórica vs WT dieta hipercalórica (p<0,05). A tabela está demonstrando a média ± erro padrão da média entre os grupos.

Recentemente foi demonstrado in vitro que a deleção do miR-22 promove a conversão de fibras musculares esqueléticas de contração rápida para lenta. Além disso, indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 apresentam uma atividade enzimática oxidativa reduzida (OBERBACH; BOSSENZ; LEHMANN; NIEBAUER *et al.*, 2006; WEN; CHEN; HUANG; CHEN *et al.*, 2020). Levando em consideração que as fibras oxidativas lentas apresentam maior capacidade oxidativa e que as alterações no tipo de fibra muscular promovida pela deleção do miR-22 podem afetar o metabolismo energético e a sensibilidade à insulina, avaliamos o efeito do miR-22 e da dieta na atividade das enzimas que estão envolvidas no metabolismo da glicose no músculo gastrocnêmio das fêmeas. As atividades da hexoquinase (HK), fosfofructoquinase (PFK) e piruvato quinase (PK) foram iguais entre os grupos (Tabela 4). No mesmo sentido, a atividade da creatina quinase (CK), importante no

metabolismo energético, foi similar entre os grupos (Tabela 4). Em conjunto, nossos resultados sugerem que a deleção do miR-22 e a obesidade induzida por dieta hipercalórica não são capazes de afetar a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo de glicose (HK, PFK e PK) e no metabolismo energético (CK) no músculo esquelético das fêmeas.

A partir disso, nos perguntamos se a deleção do miR-22 poderia influenciar a oxidação dos ácidos graxos no músculo esquelético das fêmeas. Embora a atividade da enzima citrato sintase (CS), importante do metabolismo oxidativo, não tenha sido alterada entre os grupos (Tabela 4), a atividade da β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (BHADH), que é uma enzima que participa da oxidação dos ácidos graxos, aumentou nas fêmeas KO para o miR-22 comparado com as fêmeas WT, ambas tratadas com dieta controle (Figura 17A).

A atividade da carnitina palmitoiltransferase I (CPT1), enzima que também está envolvida no processo de oxidação dos ácidos graxos, é reduzida no músculo esquelético de indivíduos obesos. Já o aumento da expressão da CPT1 estimula a oxidação dos ácidos graxos, melhorando a sensibilidade à insulina em camundongos obesos (BRUCE; HOY; TURNER; WATT *et al.*, 2009; KIM; REAVEN, 2013). Aqui, demonstramos que a atividade da CPT1 está aumentada nas fêmeas KO para o miR-22 tratadas com dieta hipercalórica comparado com seu respectivo controle (Figura 17B), sugerindo que a deleção do miR-22 aumenta a oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético de fêmeas obesas.

Considerando que a oxidação de ácidos graxos na mitocôndria é a principal via de oxidação (WANDERS; RUITER; IJLST; WATERHAM *et al.*, 2010) e que o aumento do miR-22 contribui para o dano oxidativo mitocondrial em cardiomiócitos (DU; CONG; YU; WANG *et al.*, 2016), nos perguntamos se a deleção do miR-22 poderia influenciar o conteúdo mitocondrial presente no músculo esquelético. Neste sentido, avaliamos a expressão da Aldeído desidrogenase 2 (ALDH2), uma enzima que está localizada na matriz mitocondrial, por western blot para tentar explicar de forma indireta, se as fêmeas com a deleção global do miR-22 exibiam alterações no conteúdo mitocondrial. Observamos que a ALDH2 estava aumentada no músculo esquelético das fêmeas obesas com deleção do miR-22 quando
comparadas com as fêmeas WT tratadas com dieta hipercalórica e as fêmeas KO controles (Figura 17C), sugerindo indiretamente um aumento das mitocôndrias no músculo esquelético.

Em conjunto, demonstramos evidências de que a deleção do miR-22 pode aumentar a β-oxidação de ácido graxo mitocondrial no músculo esquelético de fêmeas obesas.



Figura 17. A deleção do miR-22 aumenta a β -oxidação no músculo esquelético de fêmeas obesas. (A) Atividade enzimática da BHADH e (B) CPT1 no músculo gastrocnêmio (n=4-9). (C) Western blot do músculo gastrocnêmio para avaliação dos níveis protéicos da ALDH2 normalizados pelo ponceau em fêmeas WT e KO para o miR-22 tratadas com dieta controle (C) ou hipercalórica (Hc) durante 18 semanas (n=4-9). *WT dieta hipercalórica vs WT dieta conrole (p<0,05), #KO dieta hipercalórica vs WT dieta hipercalórica (p<0,05), \$KO dieta controle vs WT dieta controle (p<0,05).

4.12. A perda do miR-22 induz hipertrofia cardíaca em fêmeas

Anteriormente demonstramos que a expressão do miR-22 está aumentada na hipertrofia cardíaca induzida pela obesidade em camundongos machos (DINIZ;

HUANG; LIU; CHEN *et al.*, 2017). A partir disso, avaliamos se a dieta hipercalórica também seria capaz de alterar os níveis de expressão do miR-22 no coração das fêmeas WT. Observamos que a dieta hipercalórica aumentou a expressão do miR-22-3p nas fêmeas WT, mas não do miR-22-5p (Figura 18A).

As fêmeas WT tratadas com dieta hipercalórica exibiram aumento na razão peso do coração/comprimento da tíbia quando comparado ao seu respectivo controle. Esses resultados são similares aos observados em outros estudos que evidenciam que a obesidade promove hipertrofia cardíaca (LUCAS; VILA-BEDMAR; ARCONES; CRUCES-SANDE *et al.*, 2016; WONG; MARWICK, 2007). Além disso, demonstramos que a deleção do miR-22 em fêmeas aumentou o peso do coração normalizado pelo comprimento da tíbia, comparado com as fêmeas WT, ambas tratadas com dieta controle (Figura 18B). Embora a obesidade tenha aumentado o peso do coração nas fêmeas WT, o tratamento com dieta hipercalórica não foi capaz de exacerbar o peso do coração nas fêmeas KO (Figura 18B).

Algumas intervenções experimentais direcionadas ao tecido adiposo, demonstraram efeitos benéficos para o sistema cardiovascular em estudos préclínicos e em animais (OIKONOMOU; ANTONIADES, 2019). Considerando que a redução do peso corpóreo atenua a hipertrofia cardíaca associada à obesidade (TAKATSU; NAKASHIMA; TAKAHASHI; MURASE *et al.*, 2013; WANG; LIU; TSAI; CHEN *et al.*, 2012), é possível que a atenuação do peso corpóreo e da adiposidade promovida pela deleção do miR-22 possam estar contribuindo para neutralizar o crescimento cardíaco em resposta à obesidade nas fêmeas KO.

Para avaliar o impacto da deleção do miR-22 e da dieta hipercalórica no remodelamento do coração, realizamos análises histológicas. As secções transversais do coração coradas com WGA demonstraram que as fêmeas WT obesas apresentaram hipertrofia dos cardiomiócitos quando comparadas com seu respectivo controle (Figura 18C-D). Da mesma forma, a área dos cardiomiócitos das fêmeas KO para o miR-22 tratadas com dieta hipercalórica e controle foram maiores quando comparadas às fêmeas WT controles.

Trabalhos previamente publicados demonstraram que a deleção do miR-22 em machos não altera o peso do coração (GURHA; WANG; LARIMORE; SASSI *et al.*, 2013; HUANG; WANG, 2014). Um trabalho publicado por Gurha e colaboradores em 2012, reportou que embriões de camundongos com deleção do miR-22, cujo sexo não foi especificado, apresentaram defeitos morfogenéticos cardíacos, mas esses dados não foram publicados (GURHA; ABREU-GOODGER; WANG; RAMIREZ *et al.*, 2012). Neste sentido, a razão para essa discrepância em relação à hipertrofia cardíaca observada entre machos e fêmeas KO para o miR-22 ainda não está clara.

Como reportado anteriormente, o miR-22 tem como alvo validado o ERα (CLEGG; HEVENER; MOREAU; MORSELLI *et al.*, 2017; MORSELLI; SANTOS; CRIOLLO; NELSON *et al.*, 2017) e alguns estudos relataram que o estrógeno atua como protetor cardiometabólico em fêmeas (KLINGE, 2012; PANDEY; PICARD, 2009). Inicialmente, hipotetizamos que a perda do miR-22 culminaria numa melhora cardiovascular devido, possivelmente, a maior ação do ERα (Fliegner *et al.*, 2010; Schweisgut *et al.*, 2017), mas de maneira surpreendente, observamos que as fêmeas KO para o miR-22 apresentam hipertrofia cardíaca. Neste sentido, é possível que as diferenças biológicas devido ao dimorfismo sexual estejam, ao menos em parte, sendo responsáveis pelas disparidades observadas. Além disso, nossos resultados reforçam a importância de estudar o impacto das diferenças sexuais em condições fisiológicas e patológicas.

Em seguida, avaliamos o efeito da deleção do miR-22 e da dieta na fibrose miocárdica. Nenhuma diferença foi identificada entre os genótipos e dietas no conteúdo de colágeno cardíaco avaliado através da coloração com picrosirius red (Figura 18E-F). Esses dados diferem de estudos anteriores que demonstraram um aumento da deposição de colágeno no miocárdio de fêmeas tratadas com dieta hipercalórica (AROOR; HABIBI; KANDIKATTU; GARRO-KACHER *et al.*, 2017; BOSTICK; HABIBI; DEMARCO; JIA *et al.*, 2015). Essas diferenças observadas no efeito da dieta hipercalórica na fibrose cardíaca reforçam o papel da composição da dieta e do tempo de tratamento utilizado para investigar distúrbios cardiovasculares induzidos pela obesidade em fêmeas.



Figura 18. A deleção do miR-22 promove hipertrofia cardíaca em fêmeas. (A) Expressão do miR-22 analisada por qPCR no coração de fêmeas WT tratadas com dieta controle e hipercalórica durante 18 semanas (n=5-9). (B) Peso do coração normalizado pelo comprimento da tíbia (n=7-11). (C) Análise da área dos cardiomiócitos em secções transversais do coração utilizando coloração com WGA e (D) quantificação da área dos cardiomiócitos avaliada pelo ImageJ (n=3-4, barras 50µm). (E) Análise da área fibrótica em cortes transversais do coração utilizando coloração utilizando coloração com picrosirius red e (F) quantificação da área de deposição de colágeno avaliada pelo ImageJ (n=3-4, barras 100µm). *WT dieta hipercalórica vs WT dieta controle (p<0,05), **§**KO dieta controle vs WT dieta controle (p<0,05), **A** KO dieta hipercalórica vs WT dieta controle (p<0,05).

Considerando que a obesidade pode induzir hipertensão (HALL; DO CARMO; DA SILVA; WANG *et al.*, 2015), a qual pode levar à hipertrofia cardíaca e, sabendo que diversos estudos publicados nos últimos anos demonstraram que a cardioproteção observada em mulheres é perdida na obesidade ou no diabetes mellitus tipo 2 (COLAFELLA; DENTON, 2018), nos perguntamos se a deleção do miR-22 e a dieta hipercalórica poderiam alterar os parâmetros hemodinâmicos e ecocardiográficos nas fêmeas.

Para isso, a frequência cardíaca (FC) e a pressão arterial caudal (PAC) foram avaliadas por pletismografia caudal. Nossos resultados demonstraram que os grupos apresentaram valores semelhantes de PAC e FC (Tabela 5), semelhante a estudos anteriores que relataram que a obesidade induzida por dieta não foi capaz de afetar a pressão arterial sistólica de machos e fêmeas (BOSTICK; HABIBI; DEMARCO; JIA *et al.*, 2015; BÖHM; BENZ; CLEMENZ; SPRANG *et al.*, 2013; GUEDES; FRANÇA; LINO; KOYAMA *et al.*, 2016). Além disso, a frequência cardíaca durante o ecocardiograma (FC-E) não foi alterada entre os grupos (Tabela 5).

Reforçando nossos dados anteriores, a análise ecocardiográfica da morfologia cardíaca revelou que a espessura do septo interventricular na diástole (IVSd) foi maior nas fêmeas WT obesas e nas fêmeas KO para o miR-22 tratadas com as duas dietas quando comparado com seus respectivos controles (Tabela 5). Além disso, a espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (LVPWd) foi maior nas fêmeas WT obesas e nas fêmeas KO controles. Ainda, as fêmeas WT obesas apresentaram aumento do septo interventricular na sístole (IVSs) e da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole (LVPWs) quando comparado com as fêmeas WT tratadas com dieta controle (Tabela 5). Nenhuma alteração foi detectada entre os grupos na dimensão interna do ventrículo esquerdo na diástole (LVIDd) e na sístole (LVIDs).

A fração de ejeção (EF) e a fração de encurtamento (FS), parâmetros ecocardiográficos utilizados para avaliar a função sistólica do ventrículo esquerdo, foram semelhantes entre os grupos (Tabela 5). Além disso, a avaliação da função ventricular diastólica não foi alterada entre os grupos, como evidenciado no tempo

de relaxamento (IVRT) e contração (IVCT) isovolumétrico (Tabela 5). Entretanto, a razão E/A, um marcador da função diastólica do ventrículo esquerdo, foi reduzida nas fêmeas WT induzidas à obesidade quando comparadas com as fêmeas WT controle (Tabela 5).

Embora não tenhamos observado nenhuma disfunção ventricular em nossos grupos, é importante lembrar que as anormalidades funcionais cardíacas observada na obesidade induzida por dieta em machos e fêmeas já foram descritos (AROOR; HABIBI; KANDIKATTU; GARRO-KACHER *et al.*, 2017; BOSTICK; HABIBI; DEMARCO; JIA *et al.*, 2015; L'ABBATE; DI LASCIO; NICOLINI; FORINI *et al.*, 2020; LU; LU; WANG; YANG, 2019).

	Controle		Hipercalórica		
Parâmetros	WT	KO miR-22	WT	KO miR-22	
	(n=4-5)	(n=4-5)	(n=4-5)	(n=4-5)	
FC (bpm)	656 ± 14	685 ± 13	675 ± 8	650 ± 9	
PAC (mmHg)	104,11 ± 0,95	103,72 ± 5,13	99,65 ± 3,87	94,79 ± 4,31	
IVSd (mm)	$0,60 \pm 0,03$	0,64 ± 0,02 §	0,78 ± 0,01 *	0,77 ± 0,02 #	
IVSs (mm)	$0,84 \pm 0,06$	$0,86 \pm 0,02$	1,07 ± 0,04 *	$1,02 \pm 0,05$	
LVPWd (mm)	0,61 ± 0,02	0,67 ± 0,03 §	0,77 ± 0,02 *	0,72 ± 0,03	
LVPWs (mm)	$0,84 \pm 0,03$	$0,90 \pm 0,04$	1,09 ± 0,05 *	$0,98 \pm 0,05$	
LVIDd (mm)	4,01 ± 0,09	$4,07 \pm 0,07$	3,92 ± 0,13	$4,05 \pm 0,08$	
LVIDs (mm)	$2,98 \pm 0,07$	$3,13 \pm 0,09$	2,75 ± 0,15	3,01 ± 0,11	
EF (%)	50,90 ± 2,10	46,81 ± 2,65	57,48 ± 3,61	51,04 ± 2,55	
FS (%)	25,65 ± 1,30	23,26 ± 1,59	30,05 ± 2,32	25,78 ± 1,52	
IVRT (ms)	24,43 ± 2,52	22,50 ± 1,81	22,92 ± 1,03	20,05 ± 1,10	
IVCT (ms)	26,88 ± 3,36	23,17 ± 2,46	20,56 ± 1,66	21,07 ± 1,18	
E/A ratio	$4,70 \pm 0,88$	$3,02 \pm 0,65$	1,84 ± 0,15 *	$2,28 \pm 0,28$	
FC-E (bpm)	407.56 ± 14.49	417.93 ± 5.54	353.12 ± 11.45	388.43 ± 14.97	

Tabela 5. Par	âmetros her	nodinâmicos	e ecocardio	ográficos
---------------	-------------	-------------	-------------	-----------

*WT dieta hipercalórica vs WT dieta controle (p<0,05), #KO dieta hipercalórica vs KO dieta controle (p<0,05), **§**KO dieta controle vs WT dieta controle (p<0,05). A tabela está demonstrando a média ± erro padrão da média entre os grupos.

As análises de qPCR revelaram um aumento na expressão gênica de marcadores de hipertrofia cardíaca nas fêmeas WT obesas, como Myh7 e Act1 (Figura 19) quando comparadas com as fêmeas WT tratadas com dieta controle. Além disso, a deleção do miR-22 aumentou a expressão gênica da Myh6 nas

fêmeas KO comparadas às WT, ambas alimentadas com dieta controle. Ainda, fêmeas KO para o miR-22 tratadas com as duas dietas apresentaram aumento na expressão da Act1 em comparação com as fêmeas WT controles.

Observamos também que as fêmeas obesas com deleção do miR-22 apresentaram menor expressão da Myh6 e da razão Myh6/Myh7 comparadas com seus respectivos controles (Figura 19). Além disso, consistente com os dados observados na figura 18 (E-F), não observamos diferença na expressão gênica dos marcadores de fibrose, Col1a1 e Col3a1, entre os grupos (Figura 19).

Em conjunto, nossos resultados parecem indicar que a perda do miR-22 leva a hipertrofia fisiológica, com aumento da miosina de contração rápida (Myh7), enquanto o tratamento com dieta hipercalórica parece promover nas fêmeas WT obesas uma hipertrofia do tipo patológica, com aumento da miosina de contração lenta (Myh6) (MACHACKOVA; BARTA; SHALLA, 2006).

Além disso, nossos dados indicam que a deleção do miR-22 e a obesidade induzem hipertrofia cardíaca em fêmeas sem fibrose cardíaca.



Figura 19. Influência da deleção do miR-22 e da dieta na expressão gênica de marcadores hipertróficos e fibróticos. Análise da expressão gênica de marcadores hipertróficos e de fibrose avaliados por qPCR (n=3-6) no coração de fêmeas WT ou KO para o miR-22 tratadas com dieta controle ou dieta hipercalórica durante 18 semanas. *WT dieta hipercalórica vs WT dieta controle (p<0,05), #KO dieta hipercalórica vs WT dieta controle (p<0,05), **&**KO dieta hipercalórica vs WT dieta controle (p<0,05), Δ KO dieta hipercalórica vs WT dieta controle (p<0,05).

4.13. A deleção do miR-22 e a dieta hipercalórica alteram o perfil de expressão de RNAm no coração das fêmeas

Para compreender melhor os mecanismos envolvidos na hipertrofia cardíaca promovida pela deleção do miR-22 e pela obesidade, realizamos seguenciamento de RNA para identificar as alterações na expressão dos genes. O perfil transcricional demonstrou que o coração das fêmeas KO para o miR-22 tratadas com dieta controle apresentaram 2.977 genes aumentados e 627 genes reduzidos quando comparado com as fêmeas WT que receberam a mesma dieta (Figura 20). Além disso, as fêmeas WT que receberam a dieta hipercalórica demonstraram 1.888 genes aumentados e 1.716 genes reduzidos quando comparado com as fêmeas WT tratadas com dieta controle (Figura 20). Ainda, as fêmeas obesas KO para o miR-22 apresentaram 184 genes aumentados e 258 genes inibidos quando comparado com as fêmeas WT controle (Figura 20). O coração das fêmeas KO para o miR-22 tratadas com dieta hipercalórica apresentou 657 genes com expressão aumentada, enquanto 2.947 genes tiverem uma expressão reduzida em relação as fêmeas KO que receberam dieta controle (Figura 20). Por fim, as fêmeas KO obesas apresentaram 1.041 genes aumentados e 2.563 genes reduzidos em relação às fêmeas WT obesas (Figura 20).



Figura 20. Influência da dieta e da deleção do miR-22 no número de genes diferencialmente expressos. Número de genes diferencialmente expressos, avaliado por RNAseq, no coração das fêmeas WT e KO para o miR-22 tratadas com dieta controle (C) ou hipercalórica (Hc) durante 16 semanas (n=2).

Para verificar a heterogeneidade do grupo, utilizamos a abordagem de análise de componentes principais (PCA). Observamos que os grupos apresentavam uma variação entre si (PC1, 60%), demonstrando, portanto, uma influência da dieta e do genótipo, no entanto, não foi identificado uma grande variabilidade entre as amostras (PC2, 16%) (Apêndice 3).

Em seguida, realizamos uma análise de agrupamento hierárquico e mapa de calor (heatmap) comparando os grupos com hipertrofia cardíaca (WT e KO obesos e KO controle) com o grupo sem hipertrofia cardíaca (WT controle) para observar os genes diferencialmente expressos (Degs) entre os grupos (Figura 21). Embora existam degs entre as fêmeas WT e KO para o miR-22 tratadas com a dieta controle, as fêmeas tratadas com dieta hipercalórica, de ambos os genótipos, apresentam maiores diferenças entre os degs em relação às fêmeas WT controle (Figura 21), sugerindo que a obesidade induzida por dieta hipercalórica exerce um efeito mais impactante na expressão dos genes do que a deleção do miR-22.



Figura 21. Perfil dos genes diferencialmente expressos no coração de camundongos fêmeas. Agrupamento hierárquico e heatmap comparando a expressão gênica das fêmeas WT e KO tratadas com dieta hipercalórica e KO controle vs WT controle. O mapa mostra os genes diferencialmente expressos (degs) enriquecidos em vermelho e reprimidos em azul (n=2).

Em seguida, observamos que a dieta hipercalórica regulou os Degs nas fêmeas com deleção do miR-22 obesas quando comparadas com seu respectivo controle (Figura 22A) demonstrando, portanto, que a obesidade associada à perda do miR-22 também altera o padrão de expressão gênica no coração.

Ainda, observamos que a deleção do miR-22 associada à dieta hipercalórica também altera o padrão de expressão gênica no coração em relação às fêmeas WT obesas (Figura 22B).



Figura 22. A deleção do miR-22 e a obesidade alteram o perfil de genes diferencialmente expressos no coração de camundongos fêmeas. A) Agrupamento hierárquico e heatmap comparando a expressão de genes diferencialmente expressos no coração das fêmeas KO para o miR-22 tratadas com dieta hipercalórica vs KO controle e (B) WT hipercalórica. Os genes enriquecidos foram representados na cor vermelha e os genes reprimidos na cor azul (n=2).

4.14. A deleção do miR-22 e a obesidade induzida por dieta regulam vias relacionadas à hipertrofia cardíaca no coração de fêmeas.

Tendo identificado o perfil de expressão gênica nos nossos grupos e visto que os genes são regulados de maneira diferente, nos questionamos quais processos biológicos poderiam ser regulados a partir da expressão diferencial desses genes. Neste sentido, para identificar as vias biológicas que estavam sendo reguladas pela deleção do miR-22 ou pela dieta hipercalórica, analisamos os Degs utilizando Gene set enrichment analysis (GSEA) com base nos processos biológicos do Gene Ontology (GO).

Inicialmente, avaliamos o enriquecimento de Degs aumentados nos grupos com hipertrofia (WT e KO obesos e KO controle) comparado com o grupo sem hipertrofia (WT controle). Como esperado, observamos nas fêmeas KO para o miR-22 tratadas com dieta controle, o enriquecimento de vias relacionadas à resposta do hormônio tireoidiano, crescimento cardíaco, sinalização da PI3K e resposta ao fator de crescimento transformador beta (Figura 23A), de maneira similar à trabalhos publicados anteriormente (HUANG; CHEN; SEOK; ZHANG *et al.*, 2013; HUANG; WANG, 2014).

A análise revelou o enriquecimento de vias relacionadas à regulação da força de contração cardíaca, enovelamento de proteínas e oxidação de ácidos graxos nas fêmeas WT obesas (Figura 23B). Ainda, observamos nas fêmeas KO para o miR-22 tratadas com dieta hipercalórica, o enriquecimento de vias relacionadas à fosforilação oxidativa, resposta à interleucina 12 e enovelamento de proteínas (Figura 23C).

Além disso, observamos que genes relacionados às vias de homeostase redox celular, resposta à interleucina 12 e oxidação beta de ácidos graxos estavam enriquecidos nos corações das fêmeas KO obesas comparadas com seu respectivo controle (Figura 23D). No mesmo sentido, as fêmeas KO obesas apresentaram vias enriquecidas relacionadas à resposta imune inata, fosforilação oxidativa e interferon gama em comparação com as fêmeas WT que receberam a mesma dieta (Figura 23E). As vias reprimidas estão apresentadas no Apêndice 4.











Figura 23. Vias biológica enriquecidas no coração de camundongos fêmeas. Análise de enriquecimento de processos biológicos enriquecidos segundo Gene ontology (GO) utilizando o Gsea no coração das fêmeas WT e KO tratadas com dieta hipercalórica (Hc) controle (C) (FDR≤0,25; valor p≤0,05; valor NES positivo).

4.15. A deleção do miR-22 e a obesidade induzida por dieta alteram a expressão de genes ligados à hipertrofia cardíaca no coração de camundongos fêmeas.

Para nos ajudar a identificar os degs comumente regulados entre os grupos com hipertrofia, geramos uma análise de sobreposição usando o diagrama de Venn (Figura 24A). A lista com a sobreposição dos genes gerada pelo diagrama de Venn encontra-se no apêndice 5.

Nossa análise revelou cinco degs sendo regulados de maneira similar entre os grupos com hipertrofia, incluindo Acadl, Cav1, Hsp90ab1, Lonp2 e Rhoa (Figura 24A). Em seguida, realizamos a análise de expressão gênica por qPCR para examinar um subconjunto selecionado de genes relacionados à hipertrofia cardíaca, a fim de validar os resultados obtidos no RNAseq.

Consistente com os dados obtidos pelo RNAseq, a análise de qPCR identificou um aumento na expressão do RNAm da Hsp90ab1 nos grupos com hipertrofia cardíaca (fêmeas WT e KO obesas e KO controle) em comparação com as fêmeas WT tratadas com dieta controle (Figura 24B). Embora os grupos com hipertrofia também tenham apresentado um aumento na expressão de Rhoa nos dados do RNAseq, a análise da expressão do RNAm por qPCR demonstrou um aumento de Rhoa apenas nas fêmeas KO tratadas com dieta controle (Figura 24B).

De maneira similar ao que observamos no RNAseq, as fêmeas WT e KO obesas apresentaram aumento na expressão do RNAm de Calm1 em comparação com seus respectivos controles (Figura 24B). Nossos dados de RNAseq demonstraram que fêmeas WT e KO tratadas com dieta hipercalórica exibiram aumento na expressão gênica de Ppia. Entretanto, na validação por qPCR, observamos que apenas as fêmeas KO para o miR-22 tratadas com dieta hipercalórica apresentaram aumento dos níveis de RNAm do Ppia (Figura 24B). Embora o papel da Ppia não tenha sido demonstrado na hipertrofia cardíaca associada à obesidade, estudos anteriores mostraram sua contribuição na hipertrofia cardíaca induzida por angiotensina II e disfunção cardiovascular induzida pelo estresse oxidativo (CAO; YUAN; PENG; MAO *et al.*, 2019; SATOH; NIGRO; ZEIDAN; SOE *et al.*, 2011). De forma similar aos dados do RNAseq, observamos que a expressão gênica do RNAm de Yap1 e Egfr foi maior nas fêmeas KO controle (Figura 24B). Curiosamente, as fêmeas KO obesas apresentaram níveis reduzidos da expressão de RNAm desses genes, sugerindo que a inibição desses genes pode estar envolvida na prevenção da resposta hipertrófica exacerbada induzida pela obesidade e pela deleção do miR-22.

Estudos anteriores relataram o papel da Hsp90ab1 e Calm1 em diversos modelos da hipertrofia cardíaca como angiotensina II, isoproterenol e sobrecarga de pressão por constrição transversa da aorta (LEE; JANG; CHUNG, 2010; OBATA; NAGATA; IWASE; ODASHIMA *et al.*, 2005; TAMURA; MARUNOUCHI; TANONAKA, 2019; WANG; LI; LIU; ZHANG *et al.*, 2020). No mesmo sentido, trabalhos publicados nos últimos anos relataram o papel dos genes Rhoa, Calm1, Yap1 e Egfr em diversos modelos de hipertrofia cardíaca (DEVAUX; BOUSQUENAUD; RODIUS; MARIE *et al.*, 2011; ENGEBRETSEN; SKÅRDAL; BJØRNSTAD; MARSTEIN *et al.*, 2014; LIN; CRAIG; ZHANG; YUEN *et al.*, 2007; PENG; TIAN; QIAN; SKIBBA *et al.*, 2016; XIN; KIM; SUTHERLAND; QI *et al.*, 2011). No entanto, mais estudos são necessários para determinar o impacto desses genes na hipertrofia cardíaca induzida por obesidade em fêmeas.

Por fim, avaliamos a expressão de três RNAm-alvos do miR-22. A expressão do Tgfbr1, um alvo predito e validado do miR-22 que estava aumentado no RNAseq das fêmeas KO, envolvido no processo de hipertrofia cardíaca (DEVAUX; BOUSQUENAUD; RODIUS; MARIE *et al.*, 2011; WANG; ZHANG; WANG; WU *et al.*, 2018), estava aumentada no grupo KO controle, no entanto, a obesidade atenuou o aumento de sua expressão promovida pela deleção do miR-22 (Figura 24B). Além disso, a análise por qPCR demonstrou um aumento nos níveis da Thra e Pgc1a, que são alvos predito e validado do miR-22, respectivamente (DU; CONG; YU; WANG *et al.*, 2016; GURHA; WANG; LARIMORE; SASSI *et al.*, 2013), nas fêmeas KO para o miR-22 tratadas com ambas as dietas (Figura 24B).

Ainda, ressaltamos haver degs enriquecidos na análise de RNAseq como Tiam-1, Ep300 e Erbb4 (Apêndice 5) que já foram descritos associados ao processo de hipertrofia cardíaca (BERSELL; ARAB; HARING; KÜHN, 2009; VETTEL; WITTIG; VOGT; WUERTZ *et al.*, 2012; WEI; SHEHADEH; MITRANI; PESSANHA *et al.*, 2008) e que também são genes-alvos preditos do miR-22-3p. O enriquecimento desses degs podem explicar, ao menos em parte, o motivo da deleção do miR-22 promover um fenótipo hipertrófico no coração das fêmeas KO controle. No entanto, reforçamos aqui que, além da análise de expressão gênica, estudos funcionais ainda precisam ser realizados para determinar o impacto desses genes na hipertrofia cardíaca mediada pela deleção do miR-22.



Figura 24. A deleção do miR-22 e a dieta hipercalórica alteram a expressão de genes relacionados à hipertrofia cardíaca. (A) Diagrama de Venn demonstrando a sobreposição de genes expressos diferencialmente entre os grupos com fenótipo hipertrófico. (B) Análise da expressão gênica avaliada por qPCR em coração de fêmeas (n = 3-5). *WT dieta hipercalórica vs WT dieta controle (p<0,05), #KO dieta hipercalórica vs WT dieta controle (p<0,05), **&**KO dieta hipercalórica vs WT dieta controle (p<0,05), **&**KO dieta hipercalórica vs WT dieta controle (p<0,05).

Embora haviamos hipotetizamos anteriormente que a deleção do miR-22 seria capaz de mediar efeitos protetores cardiovasculares por meio da ação do seu transcrito alvo ERα, ressaltamos que em nosso estudo não encontramos nenhuma via associada à sinalização de estrógeno enriquecida no coração das fêmeas. Além disso, não foi possível avaliar a expressão gênica dos receptores de estrógeno alfa e beta (ERα e ERβ), devido a baixa expressão no tecido cardíaco.

Por fim, sumarizamos os principais resultados obtidos nesse estudo e o mecanismo de ação do miRNA-22 em camundongos fêmeas (Figura 25).



Figura 25. Proposta do possível mecanismo de ação do miR-22 nos camundongos fêmeas. As fêmeas selvagens (WT) tratadas com dieta hipercalórica desenvolvem obesidade acompanhada de aumento de massa gorda, intolerância à glicose, resistência à insulina e dislipidemia. Além disso, as fêmeas WT obesas apresentam hipertrofia cardíaca e aumento de marcadores hipertróficos. As fêmeas Knockout (KO) para o miR-22 apresentam hipertrofia cardíaca e aumento de marcadores hipertrófica, apresentam atenuação do ganho de peso e adiposidade, intolerância à glicose, prevenção da dislipidemia e da resistência à insulina, acompanhado do aumento da lipólise e menor adipogênese no tecido adiposo perigonadal e aumento da β -oxidação mitocondrial no músculo esquelético.

4.16. Potencial aplicação clínica

Embora a obesidade seja um fator de risco associado à diversos distúrbios cardiovasculares e metabólicos, ainda não sabemos quais os mecanismos biológicos subjacentes a esses distúrbios. Entretanto, diversos estudos demonstraram que a alteração de miRNAs está associada à DCV e metabólicas (DEIULIIS, 2016; LATRONICO; CONDORELLI, 2009; ROTTIERS; NÄÄR, 2012; SMALL; OLSON, 2011).

Neste sentido, compreender o papel dos miRNAs para as complicações cardiovasculares e metabólicas relacionadas à obesidade, em ambos os sexos, é extremamente importante dado seu potencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras.

Recentemente, relatamos que a obesidade promove um aumento da expressão do miR-22 no tecido adiposo e que este por sua vez, medeia alterações metabólicas induzidas pela obesidade em camundongos machos (DINIZ; HUANG; LIU; CHEN *et al.*, 2017). Em nosso estudo demonstramos que, em fêmeas obesas, a deleção do miR-22 melhora o perfil metabólico.

Além disso, um estudo recente publicado demonstrou que o treinamento aeróbico em camundongos obesos promove redução de diversos microRNAs circulantes, como o miR-22 (MENDONÇA; ROCHA; SOUSA et al., 2020). Neste sentido, com base nos resultados obtidos através dos nossos estudos, seria interessante examinar se a inibição do miR-22 pode eventualmente ser usada como uma nova abordagem terapêutica para as complicações metabólicas associadas à obesidade em mulheres.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo, avaliamos a contribuição do miR-22 nas alterações cardiovasculares e metabólicas promovidas pela obesidade em fêmeas.

Em suma, notamos que as fêmeas apresentam maior resistência à obesidade induzida por dieta hiperlipídica. No entanto, demonstramos aqui que a dieta hipercalórica foi capaz de promover o fenótipo de obesidade nas fêmeas WT.

Concluímos que a deleção do miR-22 reduz o ganho de peso corpóreo e atenua o aumento da adiposidade promovido pela obesidade através da redução da adipogênese e aumento da lipólise no tecido adiposo branco perigonadal em camundongos fêmeas.

Além disso, demonstramos que a ausência do miR-22 também foi capaz de prevenir por completo a resistência à insulina e dislipidemia promovida pela dieta hipercalórica em camundongos fêmeas e que a deleção do miR-22 aumentou a β-oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético nas fêmeas KO obesas.

Ainda, observamos que a obesidade induzida por dieta hipercalórica promoveu hipertrofia cardíaca. No entanto, de maneira surpreendente, demonstramos pela primeira vez que a deleção do miR-22 induziu hipertrofia cardíaca em camundongos fêmeas, sem disfunção ventricular e fibrose cardíaca.

Análises de RNAseq revelaram que a obesidade e a deleção do miR-22 alteram o perfil de expressão gênica no coração de camundongos fêmeas. Além disso, identificamos um enriquecimento de diversas vias associadas à hipertrofia cardíaca no coração das fêmeas WT obesas e KO tratadas com ambas dietas.

Embora o miRNA-22 exerça uma regulação específica do sexo no ganho de peso corporal ao reprimir o receptor de estrógeno α (SCHWEISGUT; SCHUTT; WÜST; WIETELMANN *et al.*, 2017), reconhecemos que seria interessante avaliar se pelo menos parte dos efeitos mediados pelo miRNA-22 nas fêmeas obesas pode estar associada ao estrógeno, no entanto, ressaltamos que embora nossos resultados tenham demonstrado que a deleção de miR-22 atenua a adiposidade induzida por dieta e previne o desenvolvimento de dislipidemia em fêmeas, o mesmo já foi demonstrado em machos (DINIZ; HUANG; LIU; CHEN *et al.*, 2017),

sugerindo que o papel benéfico da perda de miR-22 em distúrbios metabólicos relacionados à obesidade é não dependente do sexo. Além disso, a sinalização do estrógeno não foi encontrada entre as vias biológicas enriquecidas no coração das fêmeas KO controle, sugerindo que a hipertrofia cardíaca promovida pela deleção de miR-22 em camundongos fêmeas não é influenciada pelo estrógeno.

Por essas razões, neste estudo não avaliamos o impacto do estrógeno, investigando o efeito da ovariectomia, nas alterações metabólicas e cardiovasculares induzidas pela obesidade em fêmeas. No entanto, diferentes mecanismos podem estar envolvidos nos efeitos promovidos pela perda do miR-22 nos distúrbios metabólicos relacionados à obesidade em fêmeas e na hipertrofia cardíaca.

Ainda, demonstramos por qPCR que existem genes sendo regulados de maneira diferente em função da dieta e do genótipo, e que o aumento dos níveis de RNAm de Yap1, Egfr e Tgfbr1 no coração induzido pela deleção do miR-22 foi prevenido pela dieta hipercalórica.

Por fim, demonstramos aqui o papel do miR-22 nas disfunções metabólicas promovidas pela dieta obesogênica em fêmeas, no entanto, destacamos a importância de elucidar melhor efeito do dimorfismo sexual nos efeitos mediados pela deleção do miR-22 no coração.

Referências Bibliográficas

ABDULLAH, A.; PEETERS, A.; DE COURTEN, M.; STOELWINDER, J. The magnitude of association between overweight and obesity and the risk of diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. **Diabetes Res Clin Pract**, 89, n. 3, p. 309-319, Sep 2010.

ABEL, E. D.; LITWIN, S. E.; SWEENEY, G. Cardiac remodeling in obesity. **Physiol Rev**, 88, n. 2, p. 389-419, Apr 2008.

ALP, P. R.; NEWSHOLME, E. A.; ZAMMIT, V. A. Activities of citrate synthase and NAD+-linked and NADP+-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **Biochem J**, 154, n. 3, p. 689-700, Mar 1976.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, 431, n. 7006, p. 350-355, Sep 2004.

ARNOLD, A. P. A general theory of sexual differentiation. **J Neurosci Res**, 95, n. 1-2, p. 291-300, 01 2017.

AROOR, A. R.; HABIBI, J.; KANDIKATTU, H. K.; GARRO-KACHER, M. *et al.* Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibition with linagliptin reduces western dietinduced myocardial TRAF3IP2 expression, inflammation and fibrosis in female mice. **Cardiovasc Diabetol**, 16, n. 1, p. 61, 05 2017.

AVELAR, E.; CLOWARD, T. V.; WALKER, J. M.; FARNEY, R. J. *et al.* Left ventricular hypertrophy in severe obesity: interactions among blood pressure, nocturnal hypoxemia, and body mass. **Hypertension**, 49, n. 1, p. 34-39, Jan 2007.

BANKS, A. S.; KON, N.; KNIGHT, C.; MATSUMOTO, M. *et al.* SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. **Cell Metab**, 8, n. 4, p. 333-341, Oct 2008.

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

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, 136, n. 2, p. 215-233, Jan 2009.

BARTEL, D. P. Metazoan MicroRNAs. Cell, 173, n. 1, p. 20-51, Mar 2018.

BENDALE, D. S.; KARPE, P. A.; CHHABRA, R.; SHETE, S. P. *et al.* 17-β Oestradiol prevents cardiovascular dysfunction in post-menopausal metabolic syndrome by affecting SIRT1/AMPK/H3 acetylation. **Br J Pharmacol**, 170, n. 4, p. 779-795, Oct 2013.

BERNARDO, B. C.; WEEKS, K. L.; PRETORIUS, L.; MCMULLEN, J. R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy:

experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacol Ther**, 128, n. 1, p. 191-227, Oct 2010.

BERSELL, K.; ARAB, S.; HARING, B.; KÜHN, B. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. **Cell**, 138, n. 2, p. 257-270, Jul 2009.

BIEBER, L. L.; ABRAHAM, T.; HELMRATH, T. A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. **Anal Biochem**, 50, n. 2, p. 509-518, Dec 1972.

BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nat Rev Endocrinol**, 15, n. 5, p. 288-298, 05 2019.

BORCHERT, G. M.; LANIER, W.; DAVIDSON, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. **Nat Struct Mol Biol**, 13, n. 12, p. 1097-1101, Dec 2006.

BORDONE, L.; COHEN, D.; ROBINSON, A.; MOTTA, M. C. *et al.* SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. **Aging Cell**, 6, n. 6, p. 759-767, Dec 2007.

BORRAS, C.; GAMBINI, J.; VINA, J. Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males. **Front Biosci**, 12, p. 1008-1013, Jan 2007.

BOSTICK, B.; HABIBI, J.; DEMARCO, V. G.; JIA, G. *et al.* Mineralocorticoid receptor blockade prevents Western diet-induced diastolic dysfunction in female mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 308, n. 9, p. H1126-1135, May 2015.

BOURET, S.; LEVIN, B. E.; OZANNE, S. E. Gene-environment interactions controlling energy and glucose homeostasis and the developmental origins of obesity. **Physiol Rev**, 95, n. 1, p. 47-82, Jan 2015.

BRAY, N. L.; PIMENTEL, H.; MELSTED, P.; PACHTER, L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. **Nat Biotechnol**, 34, n. 5, p. 525-527, 05 2016.

BRITTON, K. A.; MASSARO, J. M.; MURABITO, J. M.; KREGER, B. E. *et al.* Body fat distribution, incident cardiovascular disease, cancer, and all-cause mortality. **J Am Coll Cardiol**, 62, n. 10, p. 921-925, Sep 2013.

BRUCE, C. R.; HOY, A. J.; TURNER, N.; WATT, M. J. *et al.* Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance. **Diabetes**, 58, n. 3, p. 550-558, Mar 2009.

BÖHM, C.; BENZ, V.; CLEMENZ, M.; SPRANG, C. *et al.* Sexual dimorphism in obesity-mediated left ventricular hypertrophy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 305, n. 2, p. H211-218, Jul 2013.

CAO, M.; YUAN, W.; PENG, M.; MAO, Z. *et al.* Role of CyPA in cardiac hypertrophy and remodeling. **Biosci Rep**, 39, n. 12, 12 2019.

CARDENAS, J. M.; DYSON, R. D.; STRANDHOLM, J. J. Bovine pyruvate kinases. I. Purification and characterization of the skeletal muscle isozyme. **J Biol Chem**, 248, n. 20, p. 6931-6937, Oct 1973.

CASTRO, A. V.; KOLKA, C. M.; KIM, S. P.; BERGMAN, R. N. Obesity, insulin resistance and comorbidities? Mechanisms of association. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 58, n. 6, p. 600-609, Aug 2014.

CECH, T. R.; STEITZ, J. A. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. **Cell**, 157, n. 1, p. 77-94, Mar 2014.

CLEGG, D.; HEVENER, A. L.; MOREAU, K. L.; MORSELLI, E. *et al.* Sex Hormones and Cardiometabolic Health: Role of Estrogen and Estrogen Receptors. **Endocrinology**, 158, n. 5, p. 1095-1105, 05 2017.

COLAFELLA, K. M. M.; DENTON, K. M. Sex-specific differences in hypertension and associated cardiovascular disease. **Nat Rev Nephrol**, 14, n. 3, p. 185-201, 03 2018.

COLLINS, D. R.; TOMPSON, A. C.; ONAKPOYA, I. J.; ROBERTS, N. *et al.* Global cardiovascular risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease in adults: systematic review of systematic reviews. **BMJ Open**, 7, n. 3, p. e013650, 03 2017.

CRABTREE, B.; HIGGINS, S. J.; NEWSHOLME, E. A. The activities of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxylase and fructose diphosphatase in muscles from vertebrates and invertebrates. **Biochem J**, 130, n. 2, p. 391-396, Nov 1972.

DEFRONZO, R. A.; TRIPATHY, D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, 32 Suppl 2, p. S157-163, Nov 2009.

DEIULIIS, J. A. MicroRNAs as regulators of metabolic disease: pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. **Int J Obes (Lond)**, 40, n. 1, p. 88-101, Jan 2016.

DEVAUX, Y.; BOUSQUENAUD, M.; RODIUS, S.; MARIE, P. Y. *et al.* Transforming growth factor β receptor 1 is a new candidate prognostic biomarker after acute myocardial infarction. **BMC Med Genomics**, 4, p. 83, Dec 2011.

DIAS, P. C.; HENRIQUES, P.; ANJOS, L. A. D.; BURLANDY, L. Obesity and public policies: the Brazilian government's definitions and strategies. **Cad Saude Publica**, 33, n. 7, p. e00006016, Jul 2017.

DINIZ, G. P.; HUANG, Z. P.; LIU, J.; CHEN, J. *et al.* Loss of microRNA-22 prevents high-fat diet induced dyslipidemia and increases energy expenditure without affecting cardiac hypertrophy. **Clin Sci (Lond)**, 131, n. 24, p. 2885-2900, Dec 2017.

DINIZ, G. P.; WANG, D. Z. Regulation of Skeletal Muscle by microRNAs. **Compr Physiol**, 6, n. 3, p. 1279-1294, Jun 2016.

DIWAN, A.; DORN, G. W. Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. **Physiology (Bethesda)**, 22, p. 56-64, Feb 2007.

DOUKETIS, J. D.; SHARMA, A. M. Obesity and cardiovascular disease: pathogenic mechanisms and potential benefits of weight reduction. **Semin Vasc Med**, 5, n. 1, p. 25-33, Feb 2005.

DU, J. K.; CONG, B. H.; YU, Q.; WANG, H. *et al.* Upregulation of microRNA-22 contributes to myocardial ischemia-reperfusion injury by interfering with the mitochondrial function. **Free Radic Biol Med**, 96, p. 406-417, 07 2016.

EL-SAYED MOUSTAFA, J. S.; FROGUEL, P. From obesity genetics to the future of personalized obesity therapy. **Nat Rev Endocrinol**, 9, n. 7, p. 402-413, Jul 2013.

ENGEBRETSEN, K. V.; SKÅRDAL, K.; BJØRNSTAD, S.; MARSTEIN, H. S. *et al.* Attenuated development of cardiac fibrosis in left ventricular pressure overload by SM16, an orally active inhibitor of ALK5. **J Mol Cell Cardiol**, 76, p. 148-157, Nov 2014.

FABBRINI, E.; SULLIVAN, S.; KLEIN, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. **Hepatology**, 51, n. 2, p. 679-689, Feb 2010.

FESTUCCIA, W. T.; BLANCHARD, P. G.; BELCHIOR, T.; CHIMIN, P. *et al.* PPARγ activation attenuates glucose intolerance induced by mTOR inhibition with rapamycin in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 306, n. 9, p. E1046-1054, May 2014.

FIORE, D.; GIANFRILLI, D.; GIANNETTA, E.; GALEA, N. *et al.* PDE5 Inhibition Ameliorates Visceral Adiposity Targeting the miR-22/SIRT1 Pathway: Evidence From the CECSID Trial. **J Clin Endocrinol Metab**, 101, n. 4, p. 1525-1534, 04 2016.

FLIEGNER, D.; SCHUBERT, C.; PENKALLA, A.; WITT, H. *et al.* Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 298, n. 6, p. R1597-1606, Jun 2010.

FLORIJN, B. W.; BIJKERK, R.; VAN DER VEER, E. P.; VAN ZONNEVELD, A. J. Gender and cardiovascular disease: are sex-biased microRNA networks a driving force behind heart failure with preserved ejection fraction in women? **Cardiovasc Res**, 114, n. 2, p. 210-225, Feb 2018.

FORD, E. S.; MAYNARD, L. M.; LI, C. Trends in mean waist circumference and abdominal obesity among US adults, 1999-2012. **JAMA**, 312, n. 11, p. 1151-1153, Sep 2014.

GARCIA, M.; MULVAGH, S. L.; MERZ, C. N.; BURING, J. E. *et al.* Cardiovascular Disease in Women: Clinical Perspectives. **Circ Res**, 118, n. 8, p. 1273-1293, Apr 2016.

GUEDES, E. C.; FRANÇA, G. S.; LINO, C. A.; KOYAMA, F. C. *et al.* MicroRNA Expression Signature Is Altered in the Cardiac Remodeling Induced by High Fat Diets. **J Cell Physiol**, 231, n. 8, p. 1771-1783, Aug 2016.

GURHA, P.; ABREU-GOODGER, C.; WANG, T.; RAMIREZ, M. O. *et al.* Targeted deletion of microRNA-22 promotes stress-induced cardiac dilation and contractile dysfunction. **Circulation**, 125, n. 22, p. 2751-2761, Jun 2012.

GURHA, P.; WANG, T.; LARIMORE, A. H.; SASSI, Y. *et al.* microRNA-22 promotes heart failure through coordinate suppression of PPAR/ERR-nuclear hormone receptor transcription. **PLoS One**, 8, n. 9, p. e75882, 2013.

HA, E. E.; BAUER, R. C. Emerging Roles for Adipose Tissue in Cardiovascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, 2018, v. 38, p.137-144.

HALDAR, S. M.; SRIVASTAVA, D. Sarcomeres and Cardiac Growth: Tension in the Relationship. **Trends Mol Med**, 22, n. 7, p. 530-533, 07 2016.

HALDAR, S. M.; SRIVASTAVA, D. Sarcomeres and Cardiac Growth: Tension in the Relationship. **Trends Mol Med**, 22, n. 7, p. 530-533, 07 2016.

HALL, J. E.; DO CARMO, J. M.; DA SILVA, A. A.; WANG, Z. *et al.* Obesityinduced hypertension: interaction of neurohumoral and renal mechanisms. **Circ Res**, 116, n. 6, p. 991-1006, Mar 2015.

HENGARTNER, H.; HARRIS, J. I. Purification by affinity chromatography, properties and crystallisation of phosphofructokinase from thermophilic microorganisms. **FEBS Lett**, 55, n. 1, p. 282-285, Jul 1975.

HILL, J. O.; WYATT, H. R.; PETERS, J. C. Energy balance and obesity. **Circulation**, 126, n. 1, p. 126-132, Jul 2012.

HU, Y.; LIU, H. X.; JENA, P. K.; SHENG, L. *et al.* inhibition reduces hepatic steatosis via FGF21 and FGFR1 induction. **JHEP Rep**, 2, n. 2, p. 100093, Apr 2020.

HUANG, Z. P.; CHEN, J.; SEOK, H. Y.; ZHANG, Z. *et al.* MicroRNA-22 regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress. **Circ Res**, 112, n. 9, p. 1234-1243, Apr 2013.

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

HUANG, Z. P.; WANG, D. Z. miR-22 in Smooth Muscle Cells: A Potential Therapy for Cardiovascular Disease. **Circulation**, 137, n. 17, p. 1842-1845, 04 2018.

IACOMINO, G.; SIANI, A. Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. **Genes Nutr**, 12, p. 23, 2017.

IBRAHIM, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obes Rev**, 11, n. 1, p. 11-18, Jan 2010.

IHME. **Global Burden of Disease Collaborative Network**. http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool, 2017.

IISMAA, S. E.; GRAHAM, R. M. Dissecting cardiac hypertrophy and signaling pathways: evidence for an interaction between multifunctional g proteins and prostanoids. **Circ Res**, 92, n. 10, p. 1059-1061, May 2003.

JIN, Q.; ZHANG, F.; YAN, T.; LIU, Z. *et al.* C/EBPalpha regulates SIRT1 expression during adipogenesis. **Cell Res**, 20, n. 4, p. 470-479, Apr 2010.

KAILA, B.; RAMAN, M. Obesity: a review of pathogenesis and management strategies. **Can J Gastroenterol**, 22, n. 1, p. 61-68, Jan 2008.

KATAHIRA, J.; YONEDA, Y. Nucleocytoplasmic transport of microRNAs and related small RNAs. **Traffic**, 12, n. 11, p. 1468-1474, Nov 2011.

KIM, S. H.; REAVEN, G. Sex differences in insulin resistance and cardiovascular disease risk. **J Clin Endocrinol Metab**, 98, n. 11, p. E1716-1721, Nov 2013.

KLIL-DRORI, A. J.; AZOULAY, L.; POLLAK, M. N. Cancer, obesity, diabetes, and antidiabetic drugs: is the fog clearing? **Nat Rev Clin Oncol**, 14, n. 2, p. 85-99, 02 2017.

KLINGE, C. M. miRNAs and estrogen action. **Trends Endocrinol Metab**, 23, n. 5, p. 223-233, May 2012.

KOPP, F.; MENDELL, J. T. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. **Cell**, 172, n. 3, p. 393-407, 01 2018.

KREK, A.; GRÜN, D.; POY, M. N.; WOLF, R. *et al.* Combinatorial microRNA target predictions. **Nat Genet**, 37, n. 5, p. 495-500, May 2005.

L'ABBATE, S.; DI LASCIO, N.; NICOLINI, G.; FORINI, F. *et al.* Murine model of left ventricular diastolic dysfunction and electro-mechanical uncoupling following high-fat diet. **Int J Obes (Lond)**, 44, n. 6, p. 1428-1439, Jun 2020.

LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, 294, n. 5543, p. 853-858, Oct 2001.

LAGRANHA, C. J.; DESCHAMPS, A.; APONTE, A.; STEENBERGEN, C. *et al.* Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. **Circ Res**, 106, n. 11, p. 1681-1691, Jun 2010.

LATRONICO, M. V.; CONDORELLI, G. MicroRNAs and cardiac pathology. **Nat Rev Cardiol**, 6, n. 6, p. 419-429, Jun 2009.

LEE, K. H.; JANG, Y.; CHUNG, J. H. Heat shock protein 90 regulates IκB kinase complex and NF-κB activation in angiotensin II-induced cardiac cell hypertrophy. **Exp Mol Med**, 42, n. 10, p. 703-711, Oct 2010.

LIN, G.; CRAIG, G. P.; ZHANG, L.; YUEN, V. G. *et al.* Acute inhibition of Rhokinase improves cardiac contractile function in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovasc Res**, 75, n. 1, p. 51-58, Jul 2007.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol**, 15, n. 12, p. 550, 2014.

LU, Y.; LU, X.; WANG, L.; YANG, W. Resveratrol attenuates high fat diet-induced mouse cardiomyopathy through upregulation of estrogen related receptor-α. **Eur J Pharmacol**, 843, p. 88-95, Jan 2019.

LUCAS, E.; VILA-BEDMAR, R.; ARCONES, A. C.; CRUCES-SANDE, M. *et al.* Obesity-induced cardiac lipid accumulation in adult mice is modulated by G protein-coupled receptor kinase 2 levels. **Cardiovasc Diabetol**, 15, n. 1, p. 155, 2016.

LYNEN, F.; WIELAND, O. β -Ketoreductase. *In*: ELSEVIER (Ed.). **Methods in Enzymology**, 1955. v. 1, cap. 94, p. 566-573.

MACHACKOVA, J.; BARTA, J.; DHALLA, N. S. Myofibrillar remodelling in cardiac hypertrophy, heart failure and cardiomyopathies. **Can J Cardiol**, 2006, 22, 953-938.

MAHAJAN, R.; LAU, D. H.; SANDERS, P. Impact of obesity on cardiac metabolism, fibrosis, and function. **Trends Cardiovasc Med**, 25, n. 2, p. 119-126, Feb 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**, 14, n. 1, p. 38-48, Jan 2013.

MALHOTRA, A.; SHARMA, S. Hypertrophic Cardiomyopathy in Athletes. **Eur Cardiol**, 12, n. 2, p. 80-82, Dec 2017.

MAUVAIS-JARVIS, F.; CLEGG, D. J.; HEVENER, A. L. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. **Endocr Rev**, 34, n. 3, p. 309-338, Jun 2013.

MENDONÇA, M.; ROCHA, K.C.; SOUSA, E.; PEREIRA, B.M.V.; OYAMA, L.M.; RODRIGUES, A.C. Aerobic exercise training regulates serum extracellular vesicle miRNAs linked to obesity to promote their benefical effects in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 2020, v.1, n. 319, p. 579-591.

MISHRA, P. K.; TYAGI, N.; KUMAR, M.; TYAGI, S. C. MicroRNAs as a therapeutic target for cardiovascular diseases. **J Cell Mol Med**, 13, n. 4, p. 778-789, Apr 2009.

MOREIRA-PAIS, A.; FERREIRA, R.; NEVES, J. S.; VITORINO, R. *et al.* Sex differences on adipose tissue remodeling: from molecular mechanisms to therapeutic interventions. **J Mol Med (Berl)**, 98, n. 4, p. 483-493, 04 2020.

MORSELLI, E.; SANTOS, R. S.; CRIOLLO, A.; NELSON, M. D. *et al.* The effects of oestrogens and their receptors on cardiometabolic health. **Nat Rev Endocrinol**, 13, n. 6, p. 352-364, 06 2017.

NAG, A. C. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. **Cytobios**, 28, n. 109, p. 41-61, 1980.

NAKAMURA, M.; SADOSHIMA, J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. **Nat Rev Cardiol**, 15, n. 7, p. 387-407, 07 2018.

NIVOIT, P.; MORENS, C.; VAN ASSCHE, F. A.; JANSEN, E. *et al.* Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. **Diabetologia**, 52, n. 6, p. 1133-1142, Jun 2009.

OBATA, K.; NAGATA, K.; IWASE, M.; ODASHIMA, M. *et al.* Overexpression of calmodulin induces cardiac hypertrophy by a calcineurin-dependent pathway. **Biochem Biophys Res Commun**, 338, n. 2, p. 1299-1305, Dec 2005.

OBERBACH, A.; BOSSENZ, Y.; LEHMANN, S.; NIEBAUER, J. *et al.* Altered fiber distribution and fiber-specific glycolytic and oxidative enzyme activity in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, 29, n. 4, p. 895-900, Apr 2006.

OIKONOMOU, E. K.; ANTONIADES, C. The role of adipose tissue in cardiovascular health and disease. **Nat Rev Cardiol**, 16, n. 2, p. 83-99, 02 2019.

OLENA, A. F.; PATTON, J. G. Genomic organization of microRNAs. J Cell Physiol, 222, n. 3, p. 540-545, Mar 2010.

OLIVEIRA, L. C.; FERRARI, G. L. M.; ARAÚJO, T. L.; MATSUDO, V. Overweight, obesity, steps, and moderate to vigorous physical activity in children. **Rev Saude Publica**, 51, n. 0, p. 38, Apr 2017.

OLIVEIRA-CARVALHO, V.; CARVALHO, V. O.; SILVA, M. M.; GUIMARÂES, G. V. *et al.* MicroRNAs: a new paradigm in the treatment and diagnosis of heart failure? **Arq Bras Cardiol**, 98, n. 4, p. 362-369, Apr 2012.

OLIVERIO, M.; SCHMIDT, E.; MAUER, J.; BAITZEL, C. *et al.* Dicer1-miR-328-Bace1 signalling controls brown adipose tissue differentiation and function. **Nat Cell Biol**, 18, n. 3, p. 328-336, Mar 2016.

OUYANG, P.; MICHOS, E. D.; KARAS, R. H. Hormone replacement therapy and the cardiovascular system lessons learned and unanswered questions. **J Am Coll Cardiol**, 47, n. 9, p. 1741-1753, May 2006.

PALMER, B. F.; CLEGG, D. J. The sexual dimorphism of obesity. **Mol Cell Endocrinol**, 402, p. 113-119, Feb 2015.

PANDEY, D. P.; PICARD, D. miR-22 inhibits estrogen signaling by directly targeting the estrogen receptor alpha mRNA. **Mol Cell Biol**, 29, n. 13, p. 3783-3790, Jul 2009.

PENG, K.; TIAN, X.; QIAN, Y.; SKIBBA, M. *et al.* Novel EGFR inhibitors attenuate cardiac hypertrophy induced by angiotensin II. **J Cell Mol Med**, 20, n. 3, p. 482-494, Mar 2016.

PIEPER, P. G.; WALKER, F. Pregnancy in women with hypertrophic cardiomyopathy. **Neth Heart J**, 21, n. 1, p. 14-18, Jan 2013.

RAUDVERE, U.; KOLBERG, L.; KUZMIN, I.; ARAK, T. *et al.* g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). **Nucleic Acids Res**, 47, n. W1, p. W191-W198, 07 2019.

REGITZ-ZAGROSEK, V.; KARARIGAS, G. Mechanistic Pathways of Sex Differences in Cardiovascular Disease. **Physiol Rev**, 97, n. 1, p. 1-37, 01 2017.

ROSEN, E. D.; HSU, C. H.; WANG, X.; SAKAI, S. *et al.* C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. **Genes Dev**, 16, n. 1, p. 22-26, Jan 2002.

ROTTIERS, V.; NÄÄR, A. M. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 13, n. 4, p. 239-250, Mar 2012.

SAMUELSSON, A. M.; MATTHEWS, P. A.; ARGENTON, M.; CHRISTIE, M. R. *et al.* Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. **Hypertension**, 51, n. 2, p. 383-392, Feb 2008.

SARWAR, R.; PIERCE, N.; KOPPE, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: current perspectives. **Diabetes Metab Syndr Obes**, 11, p. 533-542, 2018.

SATOH, K.; NIGRO, P.; ZEIDAN, A.; SOE, N. N. *et al.* Cyclophilin A promotes cardiac hypertrophy in apolipoprotein E-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 31, n. 5, p. 1116-1123, May 2011.

SCHWEISGUT, J.; SCHUTT, C.; WÜST, S.; WIETELMANN, A. *et al.* Sex-specific, reciprocal regulation of ERα and miR-22 controls muscle lipid metabolism in male mice. **EMBO J**, 36, n. 9, p. 1199-1214, 05 2017.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Res**, 13, n. 11, p. 2498-2504, Nov 2003.

SHARMA, S.; EGHBALI, M. Influence of sex differences on microRNA gene regulation in disease. **Biol Sex Differ**, 5, n. 1, p. 3, Feb 2014.

SMALL, E. M.; OLSON, E. N. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. **Nature**, 469, n. 7330, p. 336-342, Jan 2011.

SONESON, C.; LOVE, M. I.; ROBINSON, M. D. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. **F1000Res**, 4, p. 1521, 2015.

STOYELL-CONTI, F. F.; SANTOS, F.; MACHI, J. F.; HERNANDEZ, D. R. *et al.* Measurement of Mouse Heart Rate Variability using Echocardiographic System. **J Cardiovasc Echogr**, 28, n. 2, p. 90-94, 2018 Apr-Jun 2018.

STUBBINS, R. E.; HOLCOMB, V. B.; HONG, J.; NÚÑEZ, N. P. Estrogen modulates abdominal adiposity and protects female mice from obesity and impaired glucose tolerance. **Eur J Nutr**, 51, n. 7, p. 861-870, Oct 2012.

SUZUKI, H. I.; MIYAZONO, K. Emerging complexity of microRNA generation cascades. **J Biochem**, 149, n. 1, p. 15-25, Jan 2011.

TAKATSU, M.; NAKASHIMA, C.; TAKAHASHI, K.; MURASE, T. *et al.* Calorie restriction attenuates cardiac remodeling and diastolic dysfunction in a rat model of metabolic syndrome. **Hypertension**, 62, n. 5, p. 957-965, Nov 2013.

TAMURA, S.; MARUNOUCHI, T.; TANONAKA, K. Heat-shock protein 90 modulates cardiac ventricular hypertrophy via activation of MAPK pathway. **J Mol Cell Cardiol**, 127, p. 134-142, 02 2019.

TANZER, M. L.; GILVARG, C. Creatine and creatine kinase measurement. **J Biol Chem**, 234, p. 3201-3204, Dec 1959.

THAM, Y. K.; BERNARDO, B. C.; OOI, J. Y.; WEEKS, K. L. *et al.* Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. **Arch Toxicol**, 89, n. 9, p. 1401-1438, Sep 2015.

TSUJI, M.; KAWASAKI, T.; MATSUDA, T.; ARAI, T. *et al.* Sexual dimorphisms of mRNA and miRNA in human/murine heart disease. **PLoS One**, 12, n. 7, p. e0177988, 2017.

VAN ROOIJ, E.; SUTHERLAND, L. B.; QI, X.; RICHARDSON, J. A. *et al.* Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. **Science**, 316, n. 5824, p. 575-579, Apr 2007.

VETTEL, C.; WITTIG, K.; VOGT, A.; WUERTZ, C. M. *et al.* A novel player in cellular hypertrophy: Gi $\beta\gamma$ /PI3K-dependent activation of the RacGEF TIAM-1 is required for α_1 -adrenoceptor induced hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes. **J Mol Cell Cardiol**, 53, n. 2, p. 165-175, Aug 2012.

Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. **Obesidade**, 2018.

http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/25/vigitel-brasil-2018.pdf.

VILLARROYA, F.; CEREIJO, R.; VILLARROYA, J.; GIRALT, M. Brown adipose tissue as a secretory organ. **Nat Rev Endocrinol**, 13, n. 1, p. 26-35, 01 2017.

VIRANI, S. S.; ALONSO, A.; BENJAMIN, E. J.; BITTENCOURT, M. S. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, 141, n. 9, p. e139-e596, Mar 2020.

WANDERS, R. J.; RUITER, J. P.; IJLST, L.; WATERHAM, H. R. *et al.* The enzymology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its application to followup analysis of positive neonatal screening results. **J Inherit Metab Dis**, 33, n. 5, p. 479-494, Oct 2010.

WANG, H.; ZHANG, Q.; WANG, B.; WU, W. *et al.* miR-22 regulates C2C12 myoblast proliferation and differentiation by targeting TGFBR1. **Eur J Cell Biol**, 97, n. 4, p. 257-268, May 2018.

WANG, H. T.; LIU, C. F.; TSAI, T. H.; CHEN, Y. L. *et al.* Effect of obesity reduction on preservation of heart function and attenuation of left ventricular remodeling, oxidative stress and inflammation in obese mice. **J Transl Med**, 10, p. 145, Jul 2012.

WANG, L.; TANG, Z. P.; ZHAO, W.; CONG, B. H. *et al.* MiR-22/Sp-1 Links Estrogens With the Up-Regulation of Cystathionine γ-Lyase in Myocardium, Which Contributes to Estrogenic Cardioprotection Against Oxidative Stress. **Endocrinology**, 156, n. 6, p. 2124-2137, Jun 2015.

WANG, L.; WANG, Y. S.; MUGIYANTO, E.; CHANG, W. C. *et al.* as a metabolic silencer and liver tumor suppressor. **Liver Res**, 4, n. 2, p. 74-80, Jun 2020.

WANG, S.; LI, J.; LIU, Y.; ZHANG, J. *et al.* Distinct roles of calmodulin and Ca. **Biochem Biophys Res Commun**, 526, n. 4, p. 960-966, Jun 2020.

WEHBE, N.; NASSER, S. A.; PINTUS, G.; BADRAN, A. *et al.* MicroRNAs in Cardiac Hypertrophy. **Int J Mol Sci**, 20, n. 19, Sep 2019.

WEI, J. Q.; SHEHADEH, L. A.; MITRANI, J. M.; PESSANHA, M. *et al.* Quantitative control of adaptive cardiac hypertrophy by acetyltransferase p300. **Circulation**, 118, n. 9, p. 934-946, Aug 2008.

WEN, W.; CHEN, X.; HUANG, Z.; CHEN, D. *et al.* Resveratrol regulates muscle fiber type conversion via miR-22-3p and AMPK/SIRT1/PGC-1α pathway. **J Nutr Biochem**, 77, p. 108297, Mar 2020.

World Health Organization. **Cardiovascular diseases**. https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds), 2017.

World Health Organization. **Obesity and overweight**. https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight, 2020.

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. **Cell**, 75, n. 5, p. 855-862, Dec 1993.

WILLIAMS, A. H.; LIU, N.; VAN ROOIJ, E.; OLSON, E. N. MicroRNA control of muscle development and disease. **Curr Opin Cell Biol**, 21, n. 3, p. 461-469, Jun 2009.

WILSON, P. W.; D'AGOSTINO, R. B.; SULLIVAN, L.; PARISE, H. *et al.* Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. **Arch Intern Med**, 162, n. 16, p. 1867-1872, Sep 2002.

WONG, C.; MARWICK, T. H. Obesity cardiomyopathy: pathogenesis and pathophysiology. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med**, 4, n. 8, p. 436-443, Aug 2007.

WOODCOCK, E. A.; MATKOVICH, S. J. Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. **Int J Biochem Cell Biol**, 37, n. 9, p. 1746-1751, Sep 2005.

XIN, M.; KIM, Y.; SUTHERLAND, L. B.; QI, X. *et al.* Regulation of insulin-like growth factor signaling by Yap governs cardiomyocyte proliferation and embryonic heart size. **Sci Signal**, 4, n. 196, p. ra70, Oct 2011.

XIONG, J. Emerging roles of microRNA-22 in human disease and normal physiology. **Curr Mol Med**, 12, n. 3, p. 247-258, Mar 2012.

YANG, F.; CHEN, Q.; HE, S.; YANG, M. *et al.* miR-22 Is a Novel Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Modulation and Neointima Formation. **Circulation**, 137, n. 17, p. 1824-1841, Apr 2018.

YOUNG, S. G.; ZECHNER, R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. **Genes Dev**, 27, n. 5, p. 459-484, Mar 2013.

ZAYDUN, G.; TOMIYAMA, H.; HASHIMOTO, H.; ARAI, T. *et al.* Menopause is an independent factor augmenting the age-related increase in arterial stiffness in the early postmenopausal phase. **Atherosclerosis**, 184, n. 1, p. 137-142, Jan 2006.

APÊNDICES

Apêndice 1: Caracterização do tecido adiposo marrom nas fêmeas WT e KO para o miR-22 tratadas com dieta controle e hipercalórica.



(A) Análise da área dos adipócitos no tecido adiposo marrom-TAM por histologia usando a coloração de hematoxilina e eosina (n=4, barra 100 μ m). (B) Peso do TAM normalizado pelo comprimento da tíbia (g/mm). (C) Avaliação dos níveis protéicos da UCP1 no TAM por western blot em fêmeas WT e KO para o miR-22 tratadas com dieta controle ou hipercalórica durante 18 semanas (n=4-9). *WT dieta hipercalórica vs WT dieta controle (p<0,05), #KO dieta hipercalórica vs WT dieta hipercalórica (p<0,05).

Apêndice 2: Caracterização do fígado nas fêmeas WT e KO para o miR-22 tratadas com dieta controle e hipercalórica.



(A) Peso do fígado normalizado pelo comprimento da tíbia (g/mm) (n=10). (B) Análise histológica do fígado corado com hematoxilina e eosina e (C) Picrosirius red (n=3, barra 100 μ m). *WT dieta hipercalórica vs WT dieta controle (p<0,05), §KO dieta controle vs WT dieta controle (p<0,05).

Apêndice 3: Análise de PCA das amostras do RNAseq.



Análise da variação (n=2) sendo PC1 a variabilidade entre as amostras (16%) e PC2 a variabilidade entre os grupos (60%). O gráfico foi apresentado em porcentagem de variância. Os pontos representam em azul (WT dieta controle), rosa (KO dieta controle), roxo (WT dieta hipercalórica) e verde (KO dieta hipercalórica).
Apêndice 4: Vias reprimidas no coração das fêmeas.



C. KOHc vs WTC



E. KOHc vs KOC



F. KOHc vs WTHc



Enriquecimento de vias por Gene ontology (GO) utilizando Gsea a partir dos genes reprimidos no coração de fêmeas WT e KO para o miR-22 tratadas com dieta controle (C) ou hipercalórica (Hc) realizado por RNAseq (FDR≤0,25; p-valor ≤0.05; NES valor positivo).

	KOCvsWTC	WTHCvsWTC	KOCvsWTC	KOC vs	WTHC vs	KOHC vs
WTHCvsWTC + + KOHCvsV	+ KOHCvsWTC	+ KOHCvsWTC	+ WTHCvsWTC	WTC	WTC	WTC
KOHCvsWTC						
5 genes	7 genes	129 genes	16 genes	255 genes	89 genes	166 genes
ACADL	BAMBI	ACAA2	APLN	ABCD2	ACAD11	ACOX2
CAV1	CDK1	ACADM	APP	ACKR3	ADAM10	AFG1L
HSP90AB1	MTOR	ACADS	CCL7	ACVR1	ADM	ANXA2
LONP2	PPARGC1A	ACADVL	CX3CL1	ADAM9	ADRB1	ATP1B1
RHOA	PPM1A	ACAT1	CXCL10	ADIPOQ	AKAP6	ATP5F1A
	PRDM16	AIP	CXCL12	ADIPOR1	APLNR	ATP5F1B
	SNCA	AMACR	ERLIN1	ADIPOR2	ATF2	ATP5F1C
		AMFR	ETFBKMT	AGT	ATG5	ATP5MC1
		APEX1	F2R	AKAP12	ATP1A1	ATP5MC2
		ARF1	IRS1	AKT1	ATP6AP2	ATP5MC3
		ATF6	IRS2	ALKAL2	BAG4	ATP5MF
		ATP2A2	ITGAV	ANGPT1	BCAP31	ATP5PB
		AUH	LYN	ANKRD1	CALR	ATP5PD
		BAG2	PPARD	ANO6	CAPZA1	ATP5PF
		BAG3	SMAD4	ANXA1	CCDC47	BAG1
		CALM1	WNT5A	APAF1	CCT3	BNIP3
		CALM2		APOC1	CCT8	CAMK2D
		CALM3		ASPN	CD34	CCT5
		CALR3		BASP1	CLU	CHCHD10
		CANX		BCL9L	CXCL14	CISD1
		CASQ2		BMP10	CXCL9	CNN2
		CCT2		BMP3	DNAJA4	COA6
		CCT6A		BMP5	DNAJB1	COQ9
		CD47		BMP6	DNAJB9	COX4I1
		CDC42		BMPR1A	DNAJC10	COX4I2
		CFL1		BMPR2	DNAJC16	COX5A
		CHCHD4		BRAF	DOCK8	COX6A1
		CLPX		C5AR1	ECHDC1	COX6B1
		CPT2		CAT	ECPAS	COX6C
		CRTAP		CAV2	ENTPD5	COX7A1
		CSNK2A1		CBL	ERLEC1	COX7A2
		DECR1		CCL11	FADD	COX7B
		DECR2		CCL2	FKBP1A	COX7C
		DERL1		CCN1	GNAI3	COX8A
		DFFA		CCN3	GRPEL2	CTDNEP1

Apêndice 5: Lista de genes obtidos através da análise de agrupamento do Diagrama de Venn demonstrando a sobreposição entre os grupos.

DLD	CCR1	HAP1	CYC1
DNAJA1	CCR2	HERPUD1	CYCS
DNAJA2	CD36	HSP90AA1	DMAC2L
DNAJA3	CDH3	HSP90B1	DMD
DNAJB11	CDH5	HSPA1B	DNAJC15
DNAJB4	CDKN2B	HSPA2	DNAJC30
DNAJC19	CEACAM1	HSPA4L	DNAJC4
DNAJC21	CFLAR	HSPA5	DNLZ
DNAJC24	CHST11	HSPA8	ERP44
DNAJC3	CIDEA	ITGB6	FGF9
ECH1	CILP	JPH1	FZD9
ECHS1	CITED2	LAPTM4B	GID8
ECI1	COL1A1	LMNB1	GLRX5
ECI2	COL1A2	LUM	GSKIP
ETFA	COL3A1	MARCHF6	HNRNPDL
ETFDH	CREB1	MESD	HSPE1
FKBP4	CREB3L1	MLEC	IL1B
FKBP9	CRIM1	NNT	ISCU
GCDH	CRKL	NOL3	JUP
GLRX	CTDP1	PDCD4	LCP1
GLRX2	CTDSPL2	PDCL	MIF
GLRX3	CTNNB1	PLN	MSH2
GNB1	CTSB	PPIL6	MT-CO2
GNB5	CTSS	PRNP	MT-CO3
GRN	DAB2	QSOX2	MT-ND3
GRPEL1	DCN	RHBDD1	NDUFA1
GSR	DIPK2A	RNF103	NDUFA10
GSTM2	DKK3	RNF139	NDUFA11
GSTO1	DNAJC27	RNF5	NDUFA12
HADH	DSTYK	RNFT1	NDUFA3
HADHA	DUSP1	RP2	NDUFA4
HADHB	DUSP4	RYR2	NDUFA6
HNRNPA2B1	DUSP6	SDF2L1	NDUFA7
HNRNPF	EGFR	SELENOK	NDUFA8
HSD17B4	EIF3A	SLC8A1	NDUFA9
HSPA13	ELOVL5	SPN	NDUFAB1
HSPA14	EP300	STK39	NDUFAF1
HSPA9	EPOR	SVIP	NDUFB3
HSPBP1	ERBB4	TMBIM6	NDUFB4
HSPD1	ERRFI1	TMEM129	NDUFB5
HSPH1	F11R	TMUB2	NDUFB6
JAK1	F2RL1	TRDN	NDUFB8
LMAN1	FBN1	TRIM13	NDUFC1
MKKS	FBXL15	TXNDC12	NDUFC2
MTAP	FGF2	TXNDC16	NDUFS1

NGLY1	FGFBP3	UBE4A	NDUFS2
NOS2	FGFR2	UBQLN2	NDUFS3
NQO1	FGR	UBXN8	NDUFS5
NUDCD2	FLT1	UFD1	NDUFS7
PAK2	FOS	UGGT2	NDUFS8
PDIA3	FOXC2	USP14	NDUFV2
PDIA4	FSTL1	WFS1	NDUFV3
PDIA6	FURIN	WNK1	NIPSNAP2
PDRG1	FUT8	ZMPSTE24	NOA1
PEX19	FUZ	TXN	NPPB
PEX2	FZD1	TXN2	PARK7
PEX7	G6PD	TXNDC12	PDCD5
PFDN4	GATA3	TXNDC15	PDCL3
PITPNA	GATA4	TXNDC16	PDE12
PLIN5	GCLM	TXNDC9	PFDN1
PPIA	GCNT2	TXNL1	PGK1
PPIF	GDF10	UBE4A	PIN1
PPIL1	GDF15	UBQLN2	PINK1
PPIL3	GDF6	UBXN8	PPIH
PRDX1	GJA1	UFD1	PPM1B
PRDX3	GLG1	UGGT2	PRDX2
PRDX6	GPC3	USP14	PRDX5
PRKACA	GPR183	VBP1	PRELID1
PSMC6	HDAC2	VCP	PSMA1
PTGES3	HEG1	WFS1	PSMA2
PTGES3L	HMGB1	WNK1	PSMA3
RAD23B	HPGD	ZMPSTE24	PSMA4
RALA	HTRA1		PSMA5
RUVBL2	HTRA4		PSMA6
SCO2	IER3		PSMA7
SCP2	IGFBP4		PSMB10
SELENOS	IGFBP6		PSMB2
SELENOT	IL6R		PSMB3
SNRPA1	INSIG1		PSMB5
SOD2	INSIG2		PSMB7
ST13	ITGA8		PSMC1
TBCA	JAK2		PSMC2
TCP1	JARID2		PSMC4
TMEM38B	JUN		PSMC5
TMX2	KCNK2		PSMD1
TMX4	KDR		PSMD10
TRAP1	KLF4		PSMD11
TXN	KLF9		PSMD12
TXN2	LGMN		PSMD13
TXNDC15	LNPEP		PSMD14

TXN	DC9 LO>	C PSMD2
ТХ	NL1 LRRC	32 PSMD5
VE	P1 LTBF	°1 PSMD6
V	CP LTBF	Y4 PSMD7
	MAG	I2 PSMD8
	MAP2	K1 PSME1
	MAP3	K7 PSME2
	MAPI	<1 PSME3
	MFHA	.S1 PSME4
	MID1I	P1 PTGES2
	MOSP	D2 RAP1B
	NDRO	34 RBX1
	NEDI	04 RPLP0
	NF1	RPS27A
	NOX	4 SDHA
	NPN	T SDHAF2
	NPP	A SDHC
	NPT	N SDHD
	NR30	C1 SIRPA
	NRE	P SKP1
	NTF	3 SLC25A33
	NTR	K2 SOD1
	PARI	D3 SQSTM1
	PCSł	K6 STOML2
	PDGF	-C SURF1
	PDGF	-D TALDO1
	PDGF	RA TBCC
	PDK	1 TMEM38A
	PDK	4 TNKS
	PDP	2 TOLLIP
	PDPł	<1 TTC1
	PDP	R UBA52
	PEG	IO UBE2B
	PEN	K UQCR10
	PIK3A	P1 UQCR11
	PIK3C	2A UQCRB
	PIK3C	2B UQCRC1
	PIK30	CA UQCRC2
	PIK30	JB UQCRFS1
	PIK30	G UQCRH
	PIK3F	۲1 VPS35
	PIM	1
	PIP5K	18
	PIP5K	10
	PLA2	37

PLCB1	
PLEKHA1	
POSTN	
PPARA	
PPARG	
PPP2R5C	
PREX2	
PRKAA2	
PRKAR1A	
PRKCZ	
PROX1	
PRXL2C	
PTEN	
PTGER4	
PTPN11	
RAP1A	
RAPGEF2	
RBP4	
RBPJ	
RDX	
RELN	
RGS2	
RGS4	
ROCK1	
ROCK2	
RUNX2	
RUNX3	
S1PR1	
SAV1	
SDCBP	
SELP	
SEMA6A	
SERPINE1	
SERPINE2	
SFRP2	
SIRT2	
SLC33A1	
SLC9A3R1	
SMAD1	
SMAD2	
SMAD5	
SMAD6	
SMAD7	
SMAD9	
SMOC2	

SMURF2	
SNW1	
SNX25	
SORL1	
SOST	
SOX9	
SPART	
SPRED1	
SPRY1	
SPRY2	
SPRY4	
SPTBN1	
SUB1	
SULF1	
TBX20	
TBX5	
ТЕК	
TENM4	
TGFB1	
TGFBR1	
TGFBR2	
TGFBR3	
THBS1	
TIAM1	
TNFRSF11A	
TOB1	
TP53	
TWSG1	
UBB	
UNC5B	
USP9X	
VASN	
WWTR1	
XIAP	
YAP1	
YY1	
ZFP36L1	
ZFP36L2	
ZFYVE9	
ZNF423	
ZNF423	

Camundongos fêmeas WT e KO para o miR-22 tratadas com dieta controle (C) ou hipercalórica (Hc).