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 orginal.

SÃO PAULO
2020

RESUMO

De Oliveira Silva, T. **Papel do microRNA-22 nas alterações cardiovasculares e metabólicas induzidas pela obesidade em camundongos fêmeas**. 2020. 113f. 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. 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. 113f. 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.

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 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 na prevalência de 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 incidência 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. 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 o 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 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. Avaliamos portanto 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.

2. CONCLUSÃO

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

Em resumo, 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.

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.

Além disso, 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 Calm1, Yap1, Egfr e Tgfbr1 no coração induzido pela deleção do miR-22 foi prevenido pela dieta hipercalórica.

Neste sentido, demonstramos aqui o papel do miR-22 como regulador chave 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

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.

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.

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.

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

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

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.

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.

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

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.

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.