

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Análise de miRNoma em sangue periférico de indivíduos com obesidade e
resistência à insulina

AÉCIO ASSUNÇÃO BRAGA

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Análise de miRNoma em sangue periférico de indivíduos com obesidade e
resistência à insulina

AÉCIO ASSUNÇÃO BRAGA

Versão Original

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo

2018

Aécio Assunção Braga

Análise de miRNoma em sangue periférico de indivíduos com obesidade e
resistência à insulina

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata

Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

B813a Braga, Aécio Assunção
Análise de miRNoma em sangue periférico de indivíduos com obesidade e resistência à insulina / Aécio Assunção Braga. - São Paulo, 2018.
127 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

1. miRNAs. 2. obesidade. 3. insulina. 4. inflamação. 5. metabólicas. I. T. II. Hirata, Mario Hiroyuki, orientador.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais:

José Antonio Fortes Braga e Rosania Maranhão Assunção Braga

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata, por seus ensinamentos, por suas colocações, paciência, puxões de orelha, conselhos, preocupações e confiança.

A Prof^ª. Tit. Rosário Dominguez Crespo Hirata, pelo incentivo, apoio e sugestões no desenvolvimento deste trabalho e demais atividades acadêmicas.

Cristina Moreno Fajardo, mais que técnica do laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico da FCF/USP, sempre muito prestativa e paciente com todos os alunos do laboratório.

Jéssica Cassilla dos Santos, Juliana de Freitas Germano, Magda Elizabeth e Hui-Tzu Lin Wang que são amigas que fiz em São Paulo e no trabalho, e que serão eternamente lembrados pelo companheirismo.

Ao casal de amigos Raul e Renata, que foram essenciais nessa reta final do trabalho, vocês sabem que se não fosse por essa ajuda final esse trabalho não estaria escrito e impresso. Muito obrigado!!!!

Ao grande amigo Miguel Elias Farah Filho que apesar de morar na minha cidade natal, até hoje mantém esse companheirismo de um amigo.

Ao amigo e Prof. Raimundo Antonio Gomes Oliveira por ter plantado essa semente da pesquisa na minha pessoa e hoje estou conseguindo realizar meu primeiro sonho de muitos que tenho nesse ramo.

A amiga e Prof^ª. Elvira Maria Guerra Shinohara pelos conselhos, carinho e ajuda com suas palavras de apoio.

Aos meus irmãos Silvana Jozie e José Antonio Filho pela sua compreensão e companheirismo.

Aos alunos do LABMAD como: Juliana de Freitas Germano, Gisele Medeiros Bastos, Juliana Gonçalves dos Santos, Gabriela Guimarães Sousa Leite, Joás Lucas da Silva e Raquel de Oliveira.

Aos colegas de trabalho e amigos do LIMC como: Jéssica Cassilla dos Santos, Paula Helena Lima, Hui Tzu Lin Wang, Adriana R. Garófalo, Jéssica Bassani Borges, Ana Cristina, Elisangela da Silva Rodrigues Marçal e Thais Almendros.

As amigas Joice Takinami e Patricia Salgado pelo apoio, dedicação, conselhos e ajuda.

A Maria de Jesus e Raimundo que foram pessoas que conviveram desde criança e ajudaram na minha criação.

Ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, em nome de sua diretoria, pelo acesso ao hospital e confiança.

Aos médicos e colaboradores do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, Dr. André Arpad Faludi, Dr. Marcelo Chiara Bertolami, Dr. Marcelo Sampaio, Dra. Adriana Bertolami e Cristiane Kovacs pela sua dedicação na seleção de pacientes e cuidados a eles prestados.

Aos indivíduos que concordaram que concordaram em participar deste estudo o meu muito obrigado!!! Sem vocês este trabalho não poderia ser realizado.

Aos meus pais José Antonio e Rosania por estarem sempre ao meu lado, sempre incentivando a não desistir dos meus sonhos e ajudar os meus sonhos se tornarem realidades.

A deus por me proteger, dar saúde e força, para trabalhar e lutar por mais essa conquista e por colocar no meu caminho pessoas que me ajudaram a crescer pessoalmente e profissionalmente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa concedida.

Há todos muito obrigado!!!!!!!!!!

Resumo

Braga, A. A. **Análise de miRNoma em sangue periférico de indivíduos com obesidade e resistência à insulina.** 2018. 127 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

INTRODUÇÃO: A obesidade é uma doença multifatorial associada com alto risco de desenvolver resistência à insulina (RI), diabetes melito tipo 2 (DT2), síndrome metabólica (SM) e doenças cardiovasculares (DCV). Os mecanismos moleculares da fisiopatologia das doenças metabólicas não são totalmente compreendidos, emergindo a necessidade de novas estratégias. As modificações epigenéticas, especialmente os miRNAs, podem representar uma importante ferramenta, uma vez que são relacionados com o desenvolvimento de diversas doenças complexas, como as metabólicas. **OBJETIVO:** Avaliar o perfil de expressão de miRNAs séricos de indivíduos com obesidade, síndrome metabólica e resistência à insulina e sua relação com os mecanismos moleculares envolvidos nas suas fisiopatologias. **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** O estudo foi realizado no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) e no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP). Um total de 233 indivíduos foram distribuídos em três grupos: peso normal (n=47), sobrepeso (84) e obesos (102), de acordo com seu índice de massa corpórea (IMC). Os mesmos pacientes também foram re-classificados em com SM (n=89) e sem SM (n=144) de acordo com recomendações da Federação internacional de Diabetes e em com RI (n=123) e sem RI (n=110). As informações biodemográficas e amostras de sangue foram coletadas para testes laboratoriais clínicos e análises de perfis de expressão de miRNA pela *PCR array* (372 alvos). Análises *in silico* com a ferramenta *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) foi realizada para integração do perfil de miRNAs e seus genes alvos com doenças metabólicas. **RESULTADOS:** Os pacientes obesos e com RI, apresentaram aumento similar das concentrações de marcadores dos perfis lipídico, glicídico e inflamatório quando comparado com indivíduos com peso normal e sem RI. O perfil de miRNAs dos grupos obesos e com RI mostrou que o miR-346 (p=0,010; p=0,019), 483-5p (p=0,034; p=0,020), 296-3p (p=0,010; p=0,008), 1224-3p (p=0,044; p=0,012) e 95-3p (p=0,003; p=0,019) foram expressos similarmente nestes pacientes quando comparados a seus respectivos controles. Estes miRNAs, por predição *in silico*, desempenham um importante papel na regulação de vias metabólicas associadas a doenças hepáticas gordurosas, inflamação, DCV e doenças metabólicas. Na SM, o grupo portador da doença apresentou altas concentrações de marcadores do perfil lipídico, glicídico e inflamatório. O perfil de expressão de miRNA indicou uma expressão reduzida do miR-183-5p (p=0,008) e miR-301a-3p (p=0,007) e aumentada do miR-542-5p (p=0,003), miR-424-3p (p=0,040), miR-326 (p=0,037), miR-421 (p=0,023) e miR-574-3p (p=0,001) no grupo SM comparado ao sem SM. A análise de regressão linear múltipla *stepwise* indicou que a expressão aumentada do miR-421 explica em 22,5% o aumento da associação de Hb1Ac, LDL-C, PAI-1, HOMA-IR, glicose e insulina (p <0,001, p=0,014, p=0,009, p <0,001, p=0,001 e p=0,007, respectivamente). Além disso o miR-421 foi predito *in silico* estar associado com a regulação de 11 mRNA alvos envolvidos em vias regulatórias de doenças como infarto do miocárdio, obesidade, diabetes melito, esteatose

hepática, tolerância a glicose, distúrbio do metabolismo da glicose, hiperglicemia e resistência à insulina, bem como atua em vias regulatórias da resposta inflamatória, sendo associado com a variabilidade na quantidade de citocinas, massa do tecido adiposo e quantidade de leptina no sangue. Mediante a relação do miR-421 com a homeostase da glicose, sua expressão foi testada em pacientes com RI e interessantemente se manteve aumentada nesses pacientes em comparação com os sem RI ($p=0.014$). **CONCLUSÕES:** Os miR-346, miR-483-5p, miR-296-3p, miR-1224-3p e miR-95-3p podem ser considerados potenciais biomarcadores como preditores de DCV em pacientes obesos e resistência à insulina e o miR-421 um potencial biomarcador precoce de predição de risco de DCV em pacientes com síndrome metabólica.

Palavras-chave: miRNAs, obesidade, insulina, metabólicas, inflamação.

Abstract

Braga, A. A. **Analysis of miRNA in peripheral blood of the individual with obesity and insulin resistance**. 2018. 127 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

BACKGROUND: Obesity is a multifactorial disease associated with high risk of developing insulin resistance (IR), *Diabetes mellitus* type 2 (DT2), metabolic syndrome (MetS) and cardiovascular disease (CVD). Molecular mechanisms of metabolic diseases' pathophysiology are not fully understood, emerging the need for new strategies. Epigenetic modifications, especially miRNAs, may represent an important tool, since they are related to the development of several complex diseases, such as those metabolic. **OBJECTIVE:** Evaluate miRNA-derived serum expression profile in individuals with obesity, MetS and IR and their relationship with molecular mechanisms involved in the metabolic disease pathophysiology. **MATERIAL AND METHODS:** The study was conducted at the Dante Pazzanese Institute of Cardiology (IDPC) and at University Hospital of the University of São Paulo (HU/USP). Two hundred thirty-three subjects were distributed into three groups: normal weight (n = 47), overweight (n=84) and obese (n=102), according to their body mass index (BMI). The same patients were also re-classified as MetS (n=89) and Non-MetS (n=144) according to recommendations of the International Diabetes Federation and in IR (n=123) and Non-IR. Biodemographic data were registered and blood samples were collected for clinical laboratory tests and miRNA expression profiles by PCR array (372 targets). In silico analysis using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) tool was performed to integrate the miRNA profile and their target genes with metabolic diseases. **RESULTS:** Obese and IR patients had similar increases in the concentrations of lipid, glucose and inflammatory markers when compared to individuals with normal weight and without IR, respectively. miRNA profile of obese and IR groups showed that miR-346 (p = 0.010, p = 0.019), 483-5p (p = 0.034, p = 0.020), 296-3p (p = 0.010, p = 0.008), 1224-3p (p = 0.044, p = 0.012) and 95-3p (p = 0.003, p = 0.019) were similarly expressed in these patients in comparison to their respective controls. These miRNAs, by in silico prediction, play an important role in the regulation of metabolic pathways associated with fatty liver diseases, inflammation, CVD and metabolic diseases. In MetS, patients diagnosed with the disease showed high concentrations of lipid, glycogen and inflammatory markers. The miRNA expression profile indicated a reduced expression of miR-183-5p (p=0.008) and miR-301a-3p (p=0.007) and increased miR-542-5p (p=0.003), miR- 3 (p=0.040), miR-326 (p=0.037), miR-421 (p=0.023) and miR-574-3p (p=0.001) in the MetS group compared to Non-MetS. Stepwise multiple linear regression analysis indicated that increased expression of miR-421 explain in 22.5% increased of Hb1Ac, LDL-C, PAI-1, HOMA-IR, glucose and insulin (p<0.001, p=0.014, p=0.009, p<0.001, p=0.001 and p=0.007, respectively). In addition the miR-421 was predicted in silico to associated with regulation of eleven mRNA of gene targets involved in regulatory pathways of diseases such as myocardial infarction, obesity, diabetes mellitus, hepatic steatosis, glucose tolerance, glucose metabolism disorder, hyperglycemia and insulin resistance, as well inflammatory response and is also associated with variability in the amount of

cytokines, adipose tissue mass and amount of leptin in the blood. Due the relationship of miR-421 with glucose homeostasis, the miRNA expression was tested in patients with IR. Interestingly, miR-421 remained increased in these patients compared to those without IR ($p = 0.014$). **CONCLUSIONS:** The miR-346, miR-483-5p, miR-296-3p, miR-1224-3p and miR-95-3p may be potential biomarkers to predict CVD in obese and IR patients, while the miR-421 is a potential biomarker to predict CVD in MetS patients.

Key Words: miRNAs, obesity, insulin, metabolic, inflammation.

Lista de Figuras

Figura 1 – Circuito de retroalimentação entre a concentração sérica de leptina e a regulação do estímulo para a ingestão de alimentos e do gasto energético .	24
Figura 2 – Anormalidades dos adipócitos na obesidade e papel pró-aterogênico da adiposidade.....	28
Figura 3. Biogênese do miRNA e suas vias regulatórias..	32
Figura 4 – Delineamento experimental.....	39
Figura 5. Expressão relativa dos miRNAs derivados do soro entre pacientes obesos e não obesos..	51
Figura 6. Identificação das prováveis vias de interação de miR-1224-5p (A) e do miR-483-5p (B) com os mRNAs e supostos envolvimento com doenças metabólicas.	57
Figura 7. Identificação das prováveis vias de interação de miR-181a-5p (A) e do miR-1207-5p (B) com os mRNAs e supostos envolvimento com doenças metabólicas.	58
Figura 8. Identificação das prováveis vias de interação de miR-139-3p (A) e do miR-296-3p (B) com os mRNA e supostos envolvimento com doenças metabólicas.	59
Figura 9. Identificação das prováveis vias de interação de miR-1224-3p (A) e do miR-95-5p (B) com os mRNA e supostos envolvimento com doenças metabólicas.	60
Figura 10. Identificação das prováveis vias de interação de miR-27a-5p (A) e do miR-7a-2-3p (B) com os mRNA e supostos envolvimento com doenças metabólicas.	61
Figura 11. Identificação das prováveis vias de interação de miR-1-3p (A) e miR-346 (B) com os mRNA e supostos envolvimento com doenças metabólicas.	62

Figura 12. Identificação das prováveis vias de interação de miR-195-3p (A) com os mRNA e supostos envolvimento com doenças metabólicas.	63
Figura 13. Expressão relativa dos miRNAs derivados do soro entre pacientes com e sem resistência à insulina.....	67
Figura 14. Identificação das prováveis vias de interação de miR-193a-3p (A) e miR-92a-3p (B) com os mRNA e supostos envolvimento com doenças metabólicas.	71
Figura 15. Identificação das prováveis vias de interação de miR-1913 (A) e miR-181c-3p (B) com os mRNA e supostos envolvimento com doenças metabólicas.	72
Figura 16. Identificação das prováveis vias de interação de miR-499-5p (A) e miR-30a-3p (B) com os mRNA e supostos envolvimento com doenças metabólicas.	73
Figura 17. Expressão relativa dos miRNAs derivados do soro entre pacientes com e sem síndrome metabólica.....	79
Figura 18. Expressão de miRNA do soro de pacientes com e sem Síndrome metabólica.....	81
Figura 19. Identificação das prováveis vias de interação de miR-421-3p com os mRNA e supostos envolvimento com doenças metabólicas..	83
Figura 20. Curva ROC (<i>Receiver Operating Characteristic</i>) construída para avaliar o potencial marcador biológico da síndrome metabólica dos miRNAs séricos.....	85
Figura 21. Expressão de miRNA do soro de pacientes com e sem resistência à insulina.	86

Lista de Tabelas

Tabela 1. Critérios de classificação da Síndrome metabólica	38
Tabela 2. Características sociodemográficas da população estudada.....	46
Tabela 3. Dados biodemográficos e antropométrico dos indivíduos obesos, sobrepesos e com peso normal	47
Tabela 4. Dados das determinações bioquímicas dos indivíduos peso normal, sobrepeso e obeso.....	49
Tabela 5. mRNAs alvos preditos dos miRNAs diferentemente expressos em pacientes obesos e as supostas vias relacionadas com doenças metabólicas.	54
Tabela 6. Dados das determinações bioquímicas dos indivíduos sem e com resistente à insulina.....	65
Tabela 7. mRNAs alvos preditos dos miRNAs diferentemente expressos em pacientes com resistência à insulina e as supostas vias relacionadas com doenças metabólicas.....	69
Tabela 8. Características clínica, demográfica e antropométrica dos indivíduos classificados com e sem síndrome metabólica.	75
Tabela 9. Dados das determinações metabólicas, inflamatórias e adipocitocinas de pacientes com e sem síndrome metabólica.	77
Tabela 10. Regressão linear múltipla Stepwise: Contribuição do miR-421 na variabilidade dos parâmetros metabólicos e inflamatórios.	85

Lista de Abreviações

- AFIP** – Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa
- AgRP** – Proteína Relacionada a Agouti
- ALT** – Alanina Aminotransferase
- Apo A** – Apolipoproteína A
- Apo B** – Apolipoproteína B
- ARC** – Núcleo Arqueado
- AST** – Aspartato Aminotransferase
- ATP** – Adenosina Trifosfato
- AUC** – *Area Under the Curve*
- CA** – Circunferência Abdominal
- CART** – Transcrito Relacionado à Cocaína e Anfetamina
- cDNA** – Ácido Desoxirribonucleico complementar
- CEP** – Comitê de Ética em Pesquisa
- CHNS** – *China Health and Nutrition Survey*
- Ct** – *Cycle Threshold*
- DAC** – Doença Arterial Coronariana
- DCV** – Doença Cardiovascular
- DM2** – Diabetes Melito Tipo 2
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- dNTP** – Deoxirribonucleotídeo Trifosfato
- DP** – Desvio Padrão
- EDTA** – Ácido Etilenodiaminotetracético
- FC** – *Fold change*
- FCF** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas

gl – Grau de Liberdade

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

HOMA-IR – Modelo de Avaliação da Homeostase – Insulina Resistente

HOMA- β – Modelo de Avaliação da Homeostase – células β

HU – Hospital Universitário

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDPC – Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

IGF-1 – Fator 1 de Crescimento Insulina-símile

IGF-1 – Fator 1 de Crescimento Insulina-símile

IKK β – IkappaB Quinase

IL – Interleucina

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

IMC – Índice de Massa Corporal

IPA – *Ingenuity Pathway Analysis*

JNK – c-Jun N-terminal Quinase

KNHANES – *Korea National Health and Nutrition Examination Surveys*

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

LEP – Leptina

LEPR – Receptor da Leptina

LIMC – Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia

MCP – Proteína de Quimioatração de Monócitos

MCP-1 – Proteína Quimiotática de Monócitos-1

MCP-1 – Proteína Quimiotática de Monócitos-1

MESA – Estudo Multiétnico da Aterosclerose

MESA – *Multi-ETHNIC Study of Atherosclerosis*

miRs – microRNA

mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro

NCBI – Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia

NCHS – *National Center for Health Statistical*

NF-k β – Fator Nuclear kappa β

NHANES – *National Health and Nutrition Examination Statistics*

NPY – Neuropeptídeo Y

OMS – Organização Mundial da Saúde

OR – Odds Ratio

PAd – Pressão arterial diastólica

PAI-1 – Inibidor do Ativador do Plasminogênio -1

PAs – Pressão arterial sistólica

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PCRus – Proteína C Reativa Ultrassensível

POF – Pesquisa de Orçamento Familiar

POMC – Pro-opiomelanocortina

PPAR γ – Receptores ativados por proliferador de peroxissoma do tipo gama

pré-miRNA – Precursor de miRNA

pri-miRNA – Transcrito primário de miRNA

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo

RCQ – Relação Cintura/Quadril

RCQ – Relação cintura/quadril

RE – Retículo Endoplasmático

RI – resistente à insulina

RISC – Complexo de Silenciamento Induzido por RNA

RNA – Ácido Ribonucleico

ROC – *Receiver Operating Characteristic*

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

RT-qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativo

SAA – Amiloide Sérica

SM – Síndrome Metabólica

SNC – Sistema Nervoso Central

T₄ livre – Fração Livre da Tiroxina

TG – Triglicérides

TH – Temperatura de Hibridização

T_m – Temperatura de Melting

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α

TSH – Hormônio Tiroestimulante

USP – Universidade de São Paulo

UTR – Região Não Traduzida

UV – Ultravioleta

VDR – Receptor de Vitamina D

VLDL – Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

X² – Qui-quadrado

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Epidemiologia.....	21
1.2 Tecido adiposo como órgão secretor	23
1.3 Obesidade, síndrome metabólica, resistência à insulina e inflamação ...	26
1.4 Epigenética na obesidade, síndrome metabólica e resistência à insulina.....	30
2. OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo geral.....	36
2.2 Objetivos específicos	36
2. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Casuística e protocolo de estudo.....	37
3.2. Aspectos Éticos.....	39
3.3 Material biológico	39
3.4 Métodos	40
3.4.1 Determinação das medidas antropométricas.....	40
3.4.2 Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	41
3.4.3 Dosagem das proteínas séricas no soro.....	42
3.4.4 Extração microRNAs do soro e síntese do cDNA	42
3.4.5 Análise do perfil de miRNA circulante pela PCR array	42
3.4.6 Expressão diferencial dos miRNAs selecionados na PCR array em pacientes com síndrome metabólica	43
3.4.7 Análise das vias moleculares dos miRNAs.....	44
3.4.8 Análise estatística	44
4. RESULTADOS	46

4.1. Parâmetros clínicos, antropométricos e moleculares relacionados a obesidade	46
4.2. Parâmetros clínicos e moleculares relacionados à resistência à insulina	64
4.3. Parâmetros clínicos e moleculares relacionados a síndrome metabólica	74
5. DISCUSSÃO	87
6. CONCLUSÕES	100
BIBLIOGRAFIA	101
APÊNDICES	117
ANEXOS	122

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

A obesidade é uma doença multifatorial, definida como excesso de gordura corporal, resultante do desequilíbrio crônico entre consumo alimentar e gasto energético, e representa alto risco para saúde por predispor à resistência à insulina, diabetes melito tipo 2 (DM2), bem como a síndrome metabólica com consequente aumento no risco de DCV e morte (Nguyen *et al.*, 2008; Constantin *et al.*, 2010; Cristóvão *et al.*, 2011; Farooqi, 2011). Particularmente a relação entre obesidade com o DM2, pode ser relacionado ao perfil de secreção hormonal e função endócrina alterados dos adipócitos de indivíduos obesos, resultando no aumento da liberação de adipocinas e moléculas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), que desempenham um importante papel na indução de resistência à insulina (Sell *et al.*, 2006).

O aumento da prevalência da obesidade representa grande ameaça para a saúde pública no mundo, por causa das comorbidades associadas, incluindo principalmente a DM2 e DCV, que elevam as despesas e os gastos com a manutenção da saúde dos pacientes (James, 2008; Farooqi, 2011).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade representa um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (Barroso *et al.*, 2017). Dados do ano de 2016 indicaram que mais de 1,9 bilhão de adultos, com idade superior a 18 anos, foram diagnosticados com excesso peso, e destes, 650 milhões foram obesos (Índice de Massa Corpórea (IMC) $\geq 30\text{kg/m}^2$). Estima-se ainda que, atualmente, 41 milhões de crianças com idade inferior a 5 anos estão acima do peso ou obesos (WHO, 2018).

Nos Estados Unidos, em um estudo realizado pelo *National Health and Nutrition Examination Statistics* (NHANES), constatou-se que mais de um terço (34,9%) da população adulta do país é obesa, afetando 56,6% mulheres e 37,1% homens (Ogden *et al.*, 2014). Esse estudo também revelou que a prevalência da obesidade foi maior entre os negros não hispânicos (47,8%) e hispânicos (42,5%) (Ogden *et al.*, 2014).

Em outro estudo realizado com população adulta, no continente europeu, mostrou que houve aumento da frequência de indivíduos obesos. Nos homens, a prevalência, entre 1990 e 2008, passou de 4,0% para 28,3% e, nas

mulheres, de 6,2% para 36,5%. Esse aumento dos casos com obesidade foi mais significativo na Itália e na Espanha, onde a ocorrência foi maior que 25,0%, em ambos os sexos, enquanto em Portugal, na República Tcheca e na Albânia ocorreu, principalmente, nas mulheres. Os países do leste europeu e os mediterrâneos mostram maior prevalência de obesidade quando comparados aos países do oeste e do norte europeu (Berghoefer *et al.*, 2008). Na União europeia, estima-se um aumento do número de crianças com sobrepeso de 1,3 milhões por ano (Raj e Kumar, 2010).

Pesquisas realizadas em dois grandes países asiáticos, Coreia (*Korea National Health and Nutrition Examination Surveys – KNHANES*) e China (*China Health and Nutrition Survey – CHNS*) mostraram que a obesidade pode estar afetando cerca de 32,0% e 21,1% dos habitantes, respectivamente. Além disso, nos últimos 10 anos, o número de obesos quase dobrou (Du *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014).

No continente africano, foi observado que a prevalência de sobrepeso é maior nas áreas urbanas do que nas rurais e está correlacionada positivamente com a idade e o nível educacional (Van Der Merwe e Pepper, 2006). De acordo com a OMS, o número de crianças africanas que estão com sobrepeso ou obesidade quase dobrou, passando de 5,4 milhões em 1990 para 10,6 milhões em 2014 (WHO, 2016).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, o levantamento feito em 2017 sobre a prevalência da população com sobrepeso e obesidade, indicou que em média 1 em cada 5 indivíduos (18,9%) são obesos e que mais da metade da população das capitais brasileiras (54,0%) estão com excesso de peso (VIGITEL, 2018). A Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), realizada pelo IBGE no período de 2008 a 2009, mostrou que o excesso de peso afetava 50,1% dos homens e 48,0% das mulheres, sendo que, desses grupos, a obesidade atingiu 12,4% dos homens e 16,9% das mulheres adultas na população brasileira (IBGE, 2011).

Os dados apresentados pelo IBGE traduzem a urgência de se pensar políticas públicas adequadas à prevenção e tratamento do sobrepeso e obesidade (IBGE, 2015), indicando a necessidade de melhor compreender a fisiopatologia para buscar novos diagnósticos e tratamentos para obesidade.

1.2 Tecido adiposo como órgão secretor

O tecido adiposo é um órgão envolvido na secreção, produção e liberação de vários fatores peptídicos e não-peptídicos. Nesse contexto, estudos tem se atentado em investigar os principais mecanismos moleculares e hormonais e a inter-relação destes com o sistema nervoso central (SNC), visando entender a regulação entre o consumo e o gasto energético (Tschöp e Morrison, 2001; Do Prado *et al.*, 2009; Perry e Wang, 2012).

No SNC, a região responsável pela regulação do apetite é o hipotálamo, onde ocorre o processo homeostático (Murphy e Bloom, 2004; Perry e Wang, 2012). No hipotálamo funciona a regulação central de quanto é consumido de energia e do que é gasto pelo organismo, recebendo informações a respeito do balanço energético, através de sinais neuronais e hormonais que partem de diferentes regiões (núcleos) dentro do próprio hipotálamo, particularmente dos núcleos ventromedial, paraventricular e arqueado, e da área hipotalâmica lateral (Xu *et al.*, 2003).

Esses neuropeptídios podem estimular (orexígenos) ou inibir (anorexígenos) a ingestão de alimentos e atuam por mediação de receptores específicos localizados no hipotálamo. A pro-opiomelanocortina (POMC) e o transcrito regulado por anfetamina e cocaína (CART) são anorexígenos (Arora e Anubhuti, 2006; Korner, Inabet, *et al.*, 2009), enquanto que o neuropeptídeo Y (NPY), o peptídeo *agouti-relacionado* (AgRP) e as orexinas são importantes orexígenos (**Figura 1**) (Arora e Anubhuti, 2006).

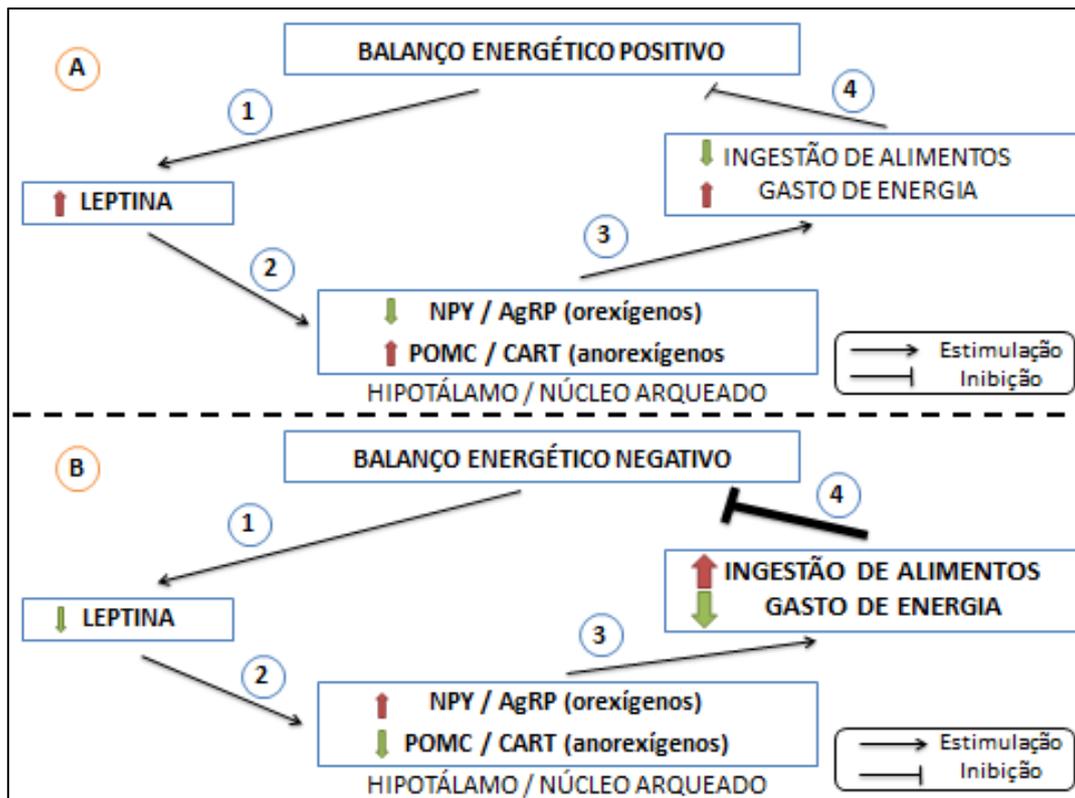


Figura 1 – Circuito de retroalimentação entre a concentração sérica de leptina e a regulação do estímulo para a ingestão de alimentos e do gasto energético. A – Mostra que, quando a ingestão de alimentos excede o gasto energético, a concentração de leptina aumenta, levando à diminuição da síntese de NPY e AgRP e ao aumento de POMC e CART no núcleo arqueado (hipotálamo), cuja consequência é a diminuição da ingestão de alimentos e o aumento do gasto de energia, a fim de reduzir o balanço energético positivo e, assim, manter o peso estável. B – Ilustra situação oposta à anterior, quando a ingestão de energia não consegue suprir a necessidade do gasto de energia, o que implica em aumento do estímulo para a ingestão de alimentos e redução do gasto energético. Nota-se que as consequências fisiológicas ilustradas no quadro B são muito maiores que as da situação A, ou seja, as repercussões no organismo, quando o balanço energético está negativo, não são apenas o inverso que no quadro A, mas, também, implicam estímulos muito mais intensos. Abreviaturas: NPY – neuropeptídeo Y; AgRP – proteína relacionada a agouti; POMC – pró-opiomelanocortina; CART – transcrito regulado por cocaína e anfetamina. Adaptado de Donato Júnior, Pedrosa e Tirapegui (2004)

Os peptídeos bioativos secretados pelo tecido adiposo compartilham ainda propriedades estruturais, como as citocinas, sendo a maioria delas produzida e secretada pelo tecido adiposo e denominada genericamente “adipocinas” (Lafontan, 2005). Entre as diversas adipocinas secretadas pelo

tecido adiposo, destacam-se a leptina, a adiponectina, a adiposina, a (Júnior *et al.*, 2004) resistina, o TNF- α , o PAI-1, as interleucinas 1 β , 6 e 8 (IL-1 β , 6 e 8), o fator 1 de crescimento insulina-símile (IGF-1), a MCP-1 e a visfatina. Exceto a adiponectina, a produção e a secreção desses diversos fatores se intensificam com a obesidade (Frühbeck *et al.*, 2001).

A leptina por exemplo é um hormônio peptídico com peso molecular de 16kDa, que apresenta uma estrutura terciária semelhante a alguns membros da família das citocinas. É produzida principalmente pelos adipócitos ou pelas células gordurosas, sendo que sua concentração varia de acordo com a quantidade de tecido adiposo (Trayhurn e Wood, 2004).

Os mecanismos do desenvolvimento da obesidade tornaram-se mais claros após a clonagem do gene da leptina, em 1994, realizado pelo grupo do Dr. Friedman, da *Rockefeller University*. Esta informação desencadeou uma verdadeira revolução na compreensão na fisiopatologia da obesidade (Zhang *et al.*, 1994). A leptina tem, entre suas ações, a ativação de receptores hipotalâmicos, inibindo a secreção do neuropeptídeo Y (NPY), diminuindo o apetite e aumentando a termogênese pela ativação do sistema nervoso simpático (Marchi-Alves *et al.*, 2010).

No entanto, o controle da saciedade ocorre pela liberação de outros hormônios, além da leptina, como aqueles produzidos pelas células do trato gastrointestinal. A grelina por exemplo é hormônio produzido pelas células epiteliais estomacais em resposta ao estado nutricional ou à entrada de alimento no estômago. A concentração de grelina plasmática aumenta durante a ingestão de alimento e diminui no final do período absorptivo, sendo o primeiro sinal que comunica ao cérebro a ingestão de alimento, através do estímulo para produção dos orexígenos NPY e AgRP no núcleo arqueado (ARC) (Murphy *et al.*, 2006; Klok *et al.*, 2007).

A adiponectina por sua vez é uma adipocinas quem também se relaciona com o perfil inflamatório em indivíduos obesos, sendo secretada exclusivamente pelo tecido adiposo (Scherer *et al.*, 1995); tem papel na regulação da homeostase da energia e funciona em combinação com a leptina (Yamauchi *et al.*, 2001). A concentração circulante dessa adipocina encontra-se diminuída na obesidade, no DM2 e na resistência à insulina (Weyer *et al.*, 2001). A adiponectina, portanto, é um fator de proteção contra as doenças

desenvolvidas em resposta ao aumento da adiposidade, inflamação e resistência à insulina, como a síndrome metabólica (Halberg *et al.*, 2008).

Outra adipocina importante é a resistina, uma proteína também muito utilizada para avaliação da obesidade em várias pesquisas (Silha *et al.*, 2003; Gürsoy *et al.*, 2012; Stepien *et al.*, 2012), sendo recentemente descoberta em ratos e expressa nos adipócitos, como um antagonista à ação da insulina, ligando, dessa maneira, a obesidade com o diabetes (Steppan *et al.*, 2001). Sua função pode estar relacionada com a homeostase da glicose e a resistência à insulina em indivíduos diabéticos (El-Shal *et al.*, 2013). Estudo realizado com pacientes apresentando obesidade mórbida, a resistina foi positivamente relacionada com IMC elevado dos pacientes estudados (Vendrell *et al.*, 2004).

Devido à produção destas adipocinas e de fatores inflamatórios pelo tecido adiposo, a obesidade é considerada doença crônica, acompanhada por processo inflamatório de baixo grau, que está associado a várias outras doenças, em particular as disfunções metabólicas (Mello *et al.*, 2006; Hossain *et al.*, 2007; Shuldiner, 2008). Portanto é emergente a melhor compreensão dos mecanismos que associam a obesidade com as doenças metabólicas e inflamatórias.

1.3 Obesidade, síndrome metabólica, resistência à insulina e inflamação

A obesidade é uma doença inflamatória crônica de baixo grau (Yudkin *et al.*, 1999; Das, 2001; Festa *et al.*, 2001; Engstrom *et al.*, 2003). Essa afirmação é suportada pelas alterações nas concentrações dos marcadores inflamatórios circulantes, que estão aumentados, na obesidade – estes marcadores incluem IL-6, TNF- α , proteína C-reativa (PCR) e outros (Das, 2001; Bulló *et al.*, 2003).

No entanto, esse conceito tem origem no fato de que as concentrações circulantes de muitas citocinas e proteínas de fase aguda à inflamação, apresenta-se elevado em pacientes obesos (Do Prado *et al.*, 2009). Os adipócitos, são responsáveis por secretarem várias citocinas e proteínas de fase aguda que, direta ou indiretamente, elevam a produção e circulação de fatores relacionados com a inflamação (Bulló *et al.*, 2003; Trayhurn *et al.*, 2007).

Existem evidências demonstrando que o estado inflamatório pode ser decorrente da resistência à ação da insulina e outras desordens associadas à obesidade, como hiperlipidemia e síndrome metabólica (Yudkin *et al.*, 1999). Além disso, os componentes da síndrome metabólica como resistência à insulina e dislipidemia e suscetibilidade e desenvolvimento da obesidade ainda tem sido associada à variação individual e a fatores genéticos/epigenéticos (Herrera *et al.*, 2011).

A síndrome metabólica é complexo de fatores de risco interrelacionados para doença cardiovascular e DM2, representados por hiperglicemia, hipertensão, dislipidemia e obesidade abdominal, que implicam risco aumentado para doença cardiovascular e mortalidade por todas as causas (Souza *et al.*, 2015).

Particularmente na obesidade, ocorre uma hipertrofia do tecido adiposo, com aumento significativo da infiltração de macrófagos ativado, aumentando assim a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Esses fatores exercem ações parácrinas, que perpetuam a inflamação local, gerando ações endócrinas que induzem a resistência à insulina e a disfunções vascular e cardíaca (**Figura 2**) (Permana *et al.*, 2006; Tilg e Moschen, 2006).

O excesso de gordura, principalmente abdominal, é responsável pelo desenvolvimento de diabetes, intolerância à glicose e outras doenças crônicas. O ganho de peso na vida adulta (na faixa de 5% do peso) também está relacionado à ocorrência de hipertensão, dislipidemia e hiperinsulinemia (Sartorelli e Franco, 2003). Há evidências de que o estado inflamatório da obesidade pode ser decorrente da resistência à insulina, hiperlipidemia e síndrome metabólica (Do Prado *et al.*, 2009).

Nesse sentido, o DM2 é uma das comorbidades mais associada à obesidade e estima-se que sua prevalência aumente de 2,8% para mais de 4,4% até 2030 (Steemburgo *et al.*, 2009). Diversos estudos já relataram que o excesso de peso é um fator de risco estabelecido para DM2 (Pinkney, 2002; Daousi *et al.*, 2006; Gregg *et al.*, 2007).

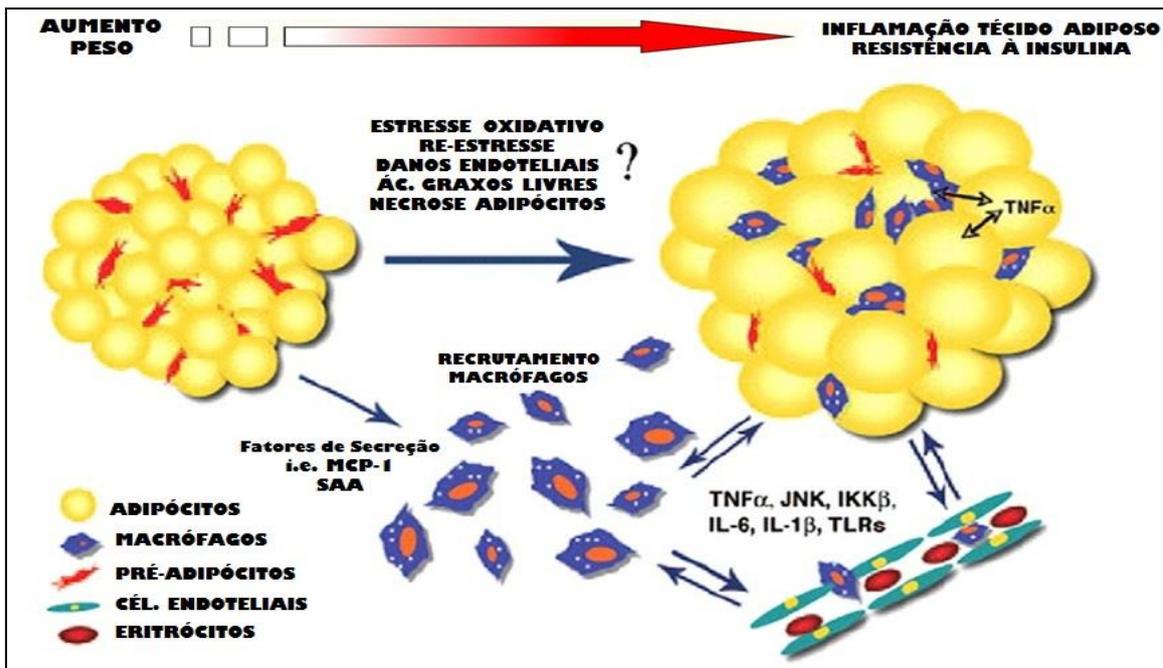


Figura 2 – Anormalidades dos adipócitos na obesidade e papel pró-aterogênico da adiposidade. O ganho de peso progressivo leva à hipertrofia dos adipócitos e ao estado pró-inflamatório, com aumento da ativação dos macrófagos, secreção de quimiocinas e citocinas e dano endotelial. RE – retículo endoplasmático; IKK β – IkappaB quinase; IL – interleucina; JNK – c-Jun N-terminal quinase; MCP – proteína de quimioatração de monócitos; SAA – amiloide sérica; TLR – receptor toll-like; TNF – fator de necrose tumoral. Adaptado de Sanz, Moreno e Fuster (2008)

Nosso grupo durante anos vem estudando a obesidade, resistência à insulina e dislipidemia, buscando demonstrar a relação genética com essas doenças (Tavares *et al.*, 2005; Hinuy *et al.*, 2008). Em estudo publicado pelo nosso grupo, observou-se que a variante LEP 3'HVR foi associada com obesidade e leptina plasmática aumentada, em amostra de nossa população (Hinuy *et al.*, 2010).

O mecanismo que explica a relação entre obesidade e DM2 ampara-se no fato de os adipócitos de indivíduos obesos apresentarem perfil de secreção e função endócrina alterados, resultando no aumento da liberação de adipocinas e moléculas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6 (Sell *et al.*, 2006), fazendo com que haja disfunção nas células- β pancreáticas, causando uma falha na liberação da insulina e aumento nas concentrações sanguíneas de glicose (Kahn *et al.*, 2006). Essa disfunção das células β representa uma possível ligação entre a obesidade e DM2 (Eckel *et al.*, 2011).

Algumas moléculas, como as adipocinas apresentam um papel importante no processo inflamatório da obesidade, por serem altamente diversificadas em termos de estrutura proteica e função fisiológica. Elas incluem citocinas clássicas, fatores de crescimento e proteínas sistêmicas complementares; também proteínas envolvidas na regulação da pressão arterial, homeostase vascular, metabolismo lipídico, glicídico e angiogênese (Do Prado *et al.*, 2009).

Em relação as citocinas, são hormônios proteicos tipicamente conhecidos como mediadores e reguladores de respostas imunes e inflamatórias (Kelly, 2001). Outros efeitos, funcionando como sensores do balanço energético, têm sido atribuídos às citocinas (Wajchenberg, 2000). Dentre todas as adipocinas relacionadas com processos inflamatórios, sem dúvida, a IL-6, o TNF- α , a leptina e adiponectina são as que mais destacam-se na literatura (Do Prado *et al.*, 2009).

Apesar do conhecimento pré-existente sobre a biologia do tecido adiposo, a busca de mecanismos moleculares emerge como uma importante ferramenta para o entendimento da fisiopatologia do aumento de massa gorda e as complicações relacionadas a obesidade. Estudos apontam que fatores genéticos, assim como sua interação com fatores ambientais e estilo de vida, tem um papel importante no desenvolvimento da obesidade (Korner, Woods, *et al.*, 2009; Hruby e Hu, 2015; Yanovski e Yanovski, 2018).

No entanto, a contribuição genética explica somente parte da herdabilidade da obesidade e suas complicações, sugerindo que modificações epigenéticas podem contribuir para melhor elucidar a fisiopatologia da obesidade. As modificações epigenéticas têm um papel crucial na regulação da expressão gênica, integridade genômica e desenvolvimento evolutivo. Consistem em alterações herdáveis e reversíveis que ocorrem através de mecanismos moleculares independentes da sequência de DNA, como a metilação do DNA e os pequenos RNAs (Lowdon *et al.*, 2016). Especialmente os microRNAs (miRs) tem emergido como potencial nova ferramenta da biologia molecular na busca de uma melhor elucidação dos mecanismos fisiopatológicos da obesidade e de suas complicações.

1.4 Epigenética na obesidade, síndrome metabólica e resistência à insulina

Nos últimos anos, novas evidências reforçam a importância dos estudos epigenômicos, os quais envolvem a avaliação da metilação de DNA, da acetilação de histonas e da expressão de microRNAs, principalmente do perfil de expressão global de microRNAs (miRNoma) na busca de novos mecanismos de controle pós-transcricional, assim como a sua participação no desenvolvimento de muitas doenças. Os miRNAs são candidatos a estarem envolvidos em doenças complexas, como a obesidade e resistência à insulina, por terem como alvo múltiplos miRs, os quais podem ser desestabilizados por um único miRNA. Embora pouco se saiba sobre o envolvimento deles no tecido adiposo, sabe-se que são reguladores do desenvolvimento dos adipócitos e estão diferentemente expressos em pacientes saudáveis e obesos (Xie *et al.*, 2009).

Os miRs são moléculas de pequenos RNAs não codificantes, os quais são compostas por cerca de 22 nucleotídeos, que foram descobertos pela primeira vez em *Caenorhabditis elegans* no início da década de 1990 (Lee *et al.*, 1993). Os miRs desempenham importante papel em reprimir a expressão do gene alvo a nível pós-transcricional (Figura 3) (Van Rooij *et al.*, 2012).

A transcrição de miRs das suas sequências genômicas é controlada pelo complexo de RNA polimerase II e por fatores de transcrição presentes no núcleo (Luo *et al.*, 2015). Os nucleotídeos dos transcritos primários dos miRs (pri-miRs) formam estruturas secundárias como as regiões “stem”, em que dois segmentos de RNA com bases complementares são pareados, e as regiões “loop”, nas quais os pares de bases não são complementares, constituindo, assim, alças circulares (stem-loop). Três tipos de miRs podem ser identificados de acordo com a localização genômica das suas sequências primárias de codificação: miRs intergênicos, miRs intrônicos e miRs exônicos. Os miRs intergênicos tem seus próprios promotores para a transcrição direta das suas sequências de pri-miR, a transcrição de miRs intrônicos e exônicos é regulada pelos promotores dos seus genes hospedeiros (Luo *et al.*, 2015).

No núcleo, os pri-miRs são processados por clivagem endonucleolítica gerando estruturas designadas como miR precursores (pré-miR). O processamento dos pré-miRs para sequências de miRs intergênicas é

mediado pela ribonuclease 3 (uma RNase tipo III, chamada de Drosha), enquanto que o processamento de miRs intrônicos e exônicos geralmente requer a modulação adicional por *splicing*. Um subtipo de miRs intrônicos, chamado 'mirtron', produz seus pré-miRs de uma maneira independente de Drosha usando apenas o *splicing* (Berezikov, 2011). O pré-miR gerado é exportado para o citoplasma por meio da proteína transportadora exportina-5 (Dangwal e Thum, 2012; Luo *et al.*, 2015). No citoplasma, os pré-miRs são processados pelo complexo enzimático Dicer (RNase tipo III), que remove a alça na estrutura *stem-loop*, resultando na formação de um duplex de miR. Este dúplex de miR é incorporado ao Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC), no qual as duas fitas de miR são separadas. Uma destas fitas permanece associada ao RISC e constitui o miR maduro, ao passo que a fita complementar pode sofrer degradação (Dangwal e Thum, 2012; Luo *et al.*, 2015).

Os miRs maduros atuam regulando os vários processos celulares, como apoptose, proliferação e diferenciação, estando ainda associados ao acometimento de diversas doenças, pois regulam negativamente a expressão gênica por ligar-se nas sequências complementares do RNAs mensageiros (mRNA), induzindo a desestabilização ou degradação do mRNA, bloqueando a etapa de tradução (Luo *et al.*, 2015).

Diversas funções têm sido atribuídas aos miRs, como diferenciação, proliferação e morte celular, desenvolvimento embrionário, metabolismo e regulação dos processos bioquímicos (Bushati e Cohen, 2007). Evidências sugerem que disfunções nos mecanismos de expressão de miRs contribuem significativamente na patogênese de diversas doenças, incluindo o câncer (Visone e Croce, 2009).

Os miRs também modulam a resposta imune inata e adaptativa contra diversos patógenos. Portanto, podem influenciar na resposta inflamatória e na progressão das infecções (Ma, F. *et al.*, 2011).

O genoma humano codifica mais de 2000 miRs, os quais estariam envolvidos na regulação de aproximadamente 20 a 30% dos mRNAs (Ha, 2011). Estudos indicam que um único mRNA pode ser regulado por diferentes miRs, e que um único miRNA pode regular distintos mRNAs (Lindow e Gorodkin, 2007; Baek *et al.*, 2008). Estima-se que, em média, existem cerca de

500 cópias de um único miRNA por célula, e esse número pode chegar a mais que 10.000 cópias dependendo do tipo celular e do miRNA (Liang *et al.*, 2007).

Aproximadamente 80% dos genes que codificam os miRs estão localizados em regiões intrônicas e, em tecidos normais, sua expressão está associada com a expressão do respectivo gene alvo, apresentando fatores de transcrição em comum. O restante é composto por grupamentos de genes de miRs, que geralmente são co-expressos, apresentando fatores de transcrição próprios (Liang *et al.*, 2007; Saini *et al.*, 2007).

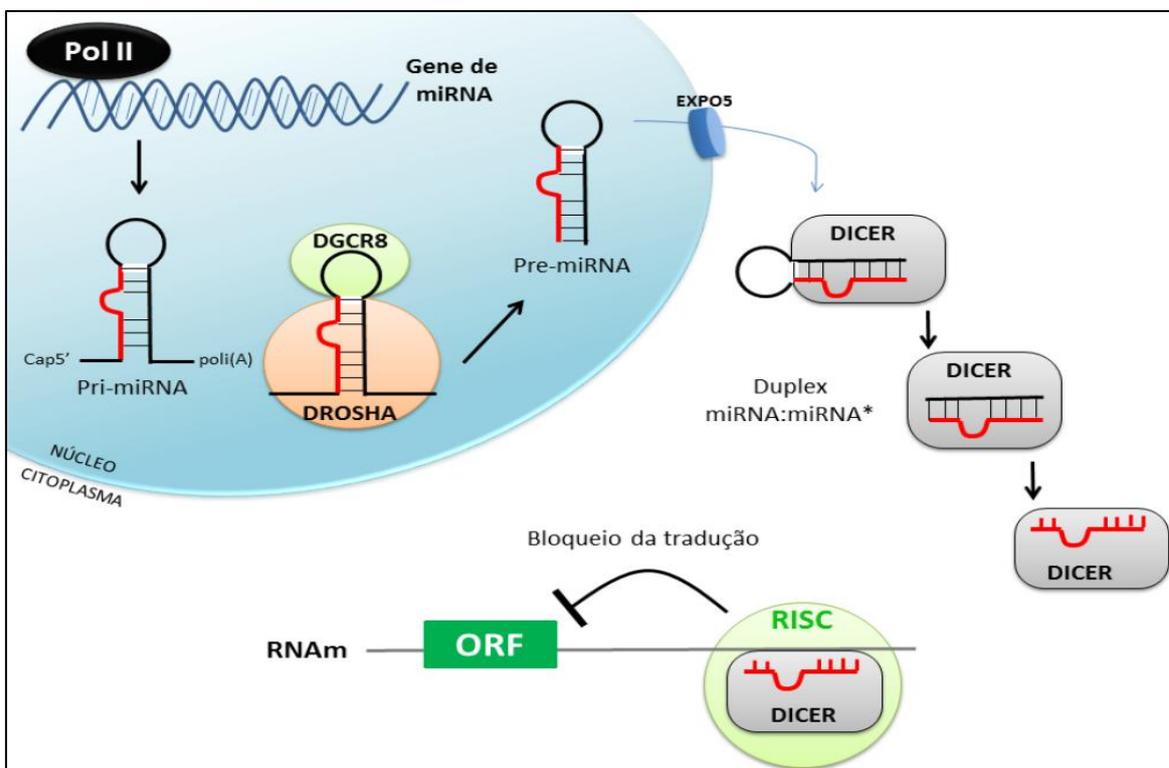


Figura 3. Biogênese do miRNA e suas vias regulatórias. A transcrição do gene de miRNA pela enzima RNA polimerase II origina o transcrito primário de miRNA (pri-miRNA), que, quando acoplado ao complexo microprocessador, é clivado pela enzima RNase III DROSHA, gerando uma estrutura intermediária de aproximadamente 70 nucleotídeos, denominada pré-miRNA (precursor de miRNA), que é exportado do núcleo ao citoplasma e processado pela enzima DICER, originando transcritos de fita dupla (miRNA:miRNA). A incorporação deste duplex miRNA:miRNA ao complexo RISC libera uma das fitas do transcrito, mantendo apenas a fita madura aderida ao complexo. Assim, o pareamento perfeito desta sequência do miRNA com o mRNA alvo provocará a degradação do mesmo; já o pareamento imperfeito inibe a maquinaria de tradução, bloqueando a síntese protéica (Dzik, 2013).

Os miRs ligam-se à região 3'UTR do mRNA alvo pelo pareamento de 2 a 7 nucleotídeos, em uma região denominada "seed". A alteração da expressão ocorre por diversos mecanismos, seja por inibição do início da tradução, pelo bloqueio do alongamento da cadeia peptídica; pela dissociação prematura da ligação ribossomal; pela degradação do mRNA (retirada da cauda poli-A e do 'cap'); ou pela atividade exonucleotídica 5' - 3' (Hu, 2009). Forman e colaboradores (2008) demonstraram que os miRs também podem se ligar a regiões codificantes e na 5'UTR.

O perfil de expressão de miRNAs pode variar de acordo com o estágio e o estado das células presentes em um dado tecido e, por essa razão, seu estudo pode ter várias aplicações, como na classificação de tipos de câncer de origem desconhecida (Pritchard *et al.*, 2012) e como potenciais marcadores de doenças humanas (Raitoharju *et al.*, 2011). Além disso, estudos prévios que demonstram a presença de miRs em fluidos biológicos como plasma e urina, na forma livre e/ou dentro de vesículas (exossomas), sugerem que essas moléculas podem ser utilizadas como biomarcadores não-invasivos em diversas patologias (Arroyo *et al.*, 2011; Turchinovich *et al.*, 2011).

Com a descoberta dos miRs, houve a necessidade de adequar os métodos de estudo de transcritos de forma mais abrangente. Atualmente, além das tecnologias já conhecidas como Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real Quantitativo (RT-qPCR) e microarranjos de DNA, o ultrassequenciamento de DNA tem sido uma ferramenta bastante importante para o estudo do miRNoma. Além da determinação do perfil de miRs já conhecidos, o ultrassequenciamento possibilita identificar miRs ainda não descritos (Pritchard *et al.*, 2012).

As várias funções exercidas pelos miRs na regulação simultânea de diversos mRNA alvos levaram os pesquisadores a deduzir que os miRs estejam envolvidos principalmente na etiopatogenia de doenças complexas, como o câncer e doenças metabólicas (dislipidemia, diabetes, obesidade e outras) (Xie *et al.*, 2009).

Esau e colaboradores (2004) verificaram que a inibição de miR-143 levou à inibição da diferenciação de cinco marcadores de adipócitos em mais de 40%, em células de mamíferos, e que a expressão de miR-143 em pré-adipócitos 3T3-L1 acelerou a formação de adipócitos, confirmando seu

importante papel na adipogênese. Porém, os resultados também mostraram que os miRs com a expressão aumentada durante a adipogênese nos camundongos tiveram sua expressão diminuída em adipócitos de camundongos obesos e vice-versa.

Estudos recentes demonstraram também que os miRs desempenham papéis significativos na produção e secreção de insulina (Rome, 2013; Wang *et al.*, 2015). Dehwah e colaboradores (2012) identificaram miRs que estão desregulados na obesidade e resistência à insulina, utilizando amostras de fígado de dois tipos de ratos obesos: ratos ob/ob e ratos com obesidade induzida por dieta. Os resultados desse estudo mostraram que o miR-103 e miR-107 são reguladores negativos da sensibilidade à insulina, sendo que a expressão hepática desses miRs estão aumentadas em roedores e seres humanos com resistência à insulina, concluindo que o silenciamento do miR-103/107 em animais obesos melhora a homeostase da glicose (Trajkovski *et al.*, 2011).

Lin e colaboradores (2009) mostraram que os miR-27a e miR-27b são relacionados com a regulação negativa da adipogênese, estando diretamente envolvidos na regulação da expressão de PPAR γ (receptores ativados por proliferador de peroxissoma do tipo gama), e que a transfecção de ambos miRs em adipócitos 3T3-L1 de ratos levou a inibição na diferenciação de adipócitos caracterizada pelo bloqueio de marcadores de adipogênese.

Estudo recente com 54 pacientes norte-americanos classificados em controle, obeso e com síndrome metabólica indicou que os miRs 320a, 197-3p, 23-3p, 221-3p, 27a-3p e 130a-3p foram menos expressos no cenário da obesidade e principalmente da síndrome metabólica, quando comparado com o grupo controle, sugerindo uma correlação significativa entre os miRs com o estado patológico destas doenças metabólicas. Além disso, sugeriu-se um potencial painel de miRNA a ser aplicado como biomarcadores de diagnóstico da doença metabólica, contribuindo na atenuação da progressão da doença antes do início da irreversibilidade (Goguet-Rubio *et al.*, 2017).

Assim, considerando a importância dos miRs na regulação de genes envolvidos em processos celulares relacionados com a obesidade e a resistência à insulina, a análise do perfil de expressão de miRs poderia contribuir para o melhor entendimento da fisiopatologia dessas condições

clínicas e para a descoberta de novos alvos de terapias baseadas em miRs (Mcgregor e Choi, 2011).

Este trabalho propõe-se estudar o perfil sérico de miRs por PCR *array* de indivíduos obesos e com resistência à insulina, afim de avaliar os mecanismos fisiopatológicos que podem estar sob influência epigenética, para possíveis descobertas de novos biomarcadores moleculares. Os resultados contribuirão para o estudo de predição de moléculas envolvidas nos mecanismos fisiopatológicos, para as doenças com elevada morbidade e mortalidade na população mundial, considerado ainda um grande problema de saúde pública.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de expressão dos miRs séricos dos indivíduos com obesidade, síndrome metabólica e resistência à insulina e sua relação com os mecanismos moleculares envolvidos nas suas fisiopatologias.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a associação dos parâmetros clínicos e laboratoriais com a obesidade e resistência à insulina;
- Avaliar a associação da expressão dos miRs séricos, com o perfil fenotípico de obesidade e resistência à insulina;
- Analisar através de estudos *in silico* as vias moleculares dos principais miRs diferentemente expressos e identificar possíveis alvos que possam estar relacionados à obesidade e resistência à insulina;
- Fornecer dados para melhor compreensão dos mecanismos moleculares relacionados a obesidade e resistência à insulina e contribuir na busca de novos biomarcadores circulantes de diagnóstico precoce das doenças metabólicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística e protocolo de estudo

Foram recrutados 233 indivíduos, com idade entre 30 e 80 anos, no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), São Paulo, SP, Brasil. Os indivíduos foram classificados em peso normal (n=47), sobrepesos (n=84) e obesos (n=102) de acordo com seu índice de massa corpórea (IMC) estabelecidos pela OMS, em obesos (IMC > 30,0 kg/m²), sobrepeso (IMC: 25,0-29,9 kg/m²) e peso normal (IMC: 18,5-24,9 kg/m²) (WHO, 2000). Os mesmos pacientes também foram re-classificados em portadores de síndrome metabólica (n=89) e sem síndrome metabólica (n=144) seguindo protocolo estabelecido pela International Diabetes Federation (2006) (**Tabela 1**), bem como com resistência a insulina (n=123) e sem resistência a insulina (n=110) seguindo os critérios previamente estabelecidos: IMC > 28,9 kg/m² e HOMA-IR > 4,65, ou IMC > 27,5 kg/m² e HOMA-IR > 3,60 (Stern *et al.*, 2005).

Os critérios de exclusão foram obesidade secundária a hipogonadismo em homens, como nas síndromes de Prader-Willi e Bardet-Biedl; ou hiperandrogenismo em mulheres que apresentam síndrome do ovário policístico; disfunções hormonais como síndrome de Cushing ou hipotireoidismo e hipertireoidismo; ou que foram submetidos à terapia ou cirurgias que possam induzir ao desenvolvimento da obesidade, não foram incluídos no presente estudo. O desenho experimental foi conduzido de acordo com o fluxograma apresentado abaixo (**Figura 4**).

Tabela 1. Critérios de classificação da Síndrome metabólica

CRITÉRIO OBRIGATÓRIO	MAIS 2 DE 4 CRITÉRIOS
Europídeos: ≥ 94 cm (H); ≥ 80 cm (M);	Triglicérides ≥ 150 mg/dl ou tratamento HDL < 40 mg/dl (H); < 50 mg/dl (M)
Sul-africanos, Mediterrâneo Ocidental e Oriente Médio: idem a europídeos;	PAs ≥ 130 ou PAd ≥ 85 mmHg ou tratamento
Sul-asiáticos e Chineses: ≥ 90 cm (H); ≥ 80 cm (M);	Glicemia de jejum ≥ 100 mg/dl ou diagnóstico prévio de diabetes
Japoneses: ≥ 90 cm (H); ≥ 85 cm (M);	(Se glicemia > 99 mg/dl, o teste de tolerância à glicose é recomendado, mas não necessário para diagnóstico da síndrome metabólica).
Sul-americanos e América Central: usar referências dos sul-asiáticos.	

PAs: pressão arterial sistólica; PAd: pressão arterial diastólica; H: homens; M: mulheres.

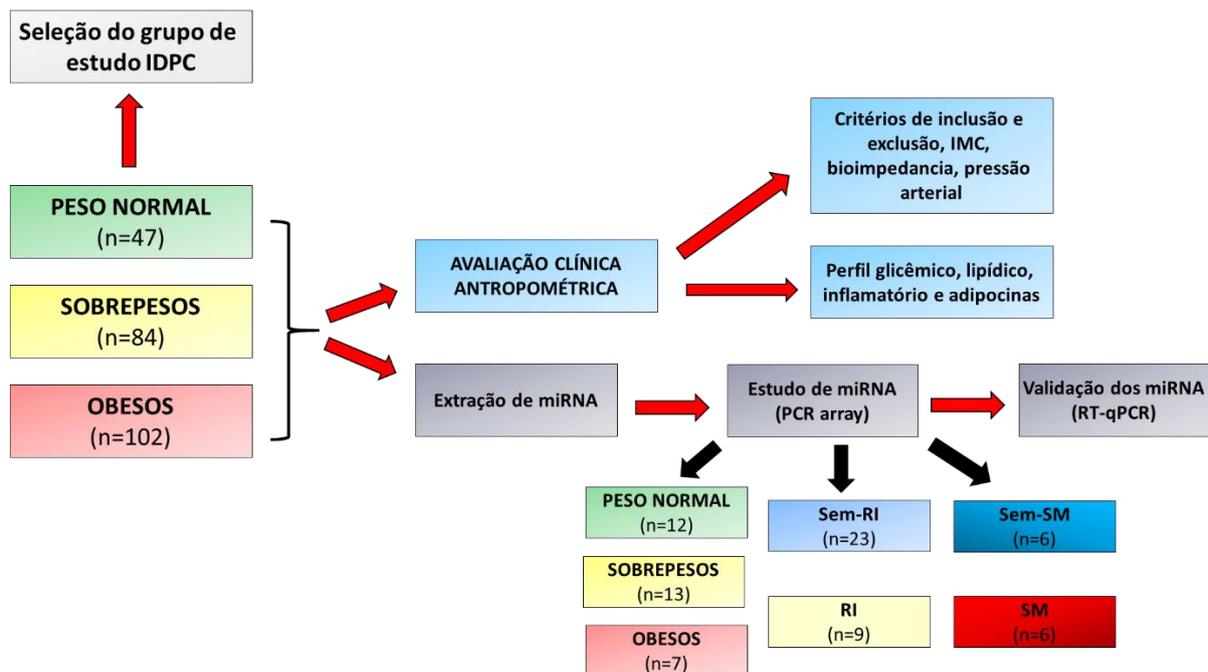


Figura 4 – Delineamento experimental.

3.2. Aspectos Éticos

Todos os indivíduos que concordaram participar da pesquisa foram informados sobre os procedimentos do estudo, bem como assinaram um termo livre e esclarecido antes da sua inclusão no protocolo. O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do IDPC (CEP-IDPC), processo de número 4134 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEP-FCF/USP), processo de número 31.2013-P585.

3.3 Material biológico

As amostras de sangue periférico foram colhidas em indivíduos que se encontrava em jejum de 12 horas, utilizando o sistema de coleta a vácuo em tubos modelo Vacutainer™ (Becton Dickinson Company, Plymouth, Reino Unido). Foram coletadas 4,0 mL de sangue periférico em EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético), para realização do hemograma completo e hemoglobina glicada; 2 mL com fluoreto de sódio para determinação da concentração plasmática de glicose; 4 mL com citrato de sódio para dosagem de fibrinogênio; e para as determinações das concentrações de colesterol total e frações, triacilglicerois, apolipoproteínas A1 (apo A1) e B (apo B), hormônio estimulador da tireoide (TSH), tiroxina livre (T₄ livre), ureia, creatinina, insulina

e proteína C reativa ultrasensível (PCR-us), assim como as atividades enzimáticas da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e extração de miRNA circulante, utilizou-se tubos de 5 mL sem anticoagulante e com gel separador.

3.4 Métodos

3.4.1 Determinação das medidas antropométricas

O peso e a altura dos voluntários foram aferidos utilizando-se uma balança mecânica para pesagem de humanos contendo aferidor de altura (Filizola S.A., São Paulo, Brasil), com o mínimo possível de roupas e descalços (Monteiro, 1998). O IMC foi estimado pela fórmula $IMC = \text{peso (kg)} / \text{altura}^2$, e foi utilizado para a classificação dos participantes do estudo de acordo com o peso e altura. A aferição da circunferência abdominal foi feita com o indivíduo estando em pé, em posição ereta, utilizando-se uma fita métrica flexível inextensível de 200 cm de comprimento, com precisão de uma casa decimal. Para garantir a validade e a fidedignidade das medidas, observou-se rigorosamente a posição da fita no momento da medição, mantendo-a no plano horizontal. Para obtenção dos valores das circunferências, circundava-se com a fita o local do corpo que se desejava medir, sendo a mesma colocada com firmeza, sem esticar excessivamente, evitando-se, assim, a compressão do tecido subcutâneo. A leitura foi feita no centímetro mais próximo, no ponto de cruzamento da fita. As circunferências foram aferidas com o indivíduo usando apenas a roupa íntima, em posição ortostática, abdômen relaxado, braços ao lado do corpo e os pés juntos, e foi utilizado para a classificação dos participantes do estudo, para risco de complicações metabólicas. A medida da circunferência da cintura foi tomada na altura da cintura natural do indivíduo, que é a parte mais estreita do tronco, e a circunferência do quadril foi medida na extensão máxima das nádegas (Ferreira *et al.*, 2006). Para relação cintura/quadril, foram usados como valores de corte 0,90 para homens e 0,85 para mulheres (WHO, 2000). A medida da composição corporal foi avaliada por impedância elétrica, utilizando-se o impedanciômetro modelo 310e (RJL Systems, In, EUA).

3.4.2 Determinação dos parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos foram determinados pelo Laboratório de Análises Clínicas, da Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP), entidade associada ao IDPC. O hemograma completo com contagem de plaquetas foi realizado pelo método citoquímico/isovolumétrico ou de impedância automatizado *ABX Pentra 120* (ABX, Kyoto, Japão) e *ABX Pentra 80* (ABX, Kyoto, Japão).

A determinação da atividade da AST, ALT, assim como a quantificação da concentração de glicose, uréia, creatinina, colesterol total, HDL e triacilglicerol, foi realizada por cinéticos no UV, métodos colorimétricos e enzimáticos automatizados, respectivamente, nos equipamentos *Dimension[®] RXL* (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, USA) e *XPAND* (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, USA). Os valores de colesterol VLDL e LDL foram calculados segundo a fórmula de Friedewald e colaboradores (Friedewald *et al.*, 1972).

Na determinação dos valores de TSH, T₄ livre e insulina foi utilizado o método de quimiluminescência automatizada *IMMULITE[®]* (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, EUA).

Para dosagens de PCR-us, apo A e apo B foi utilizado o método de imunensaio-turbidimétrico automatizado, com leitura no aparelho Hitachi-modelo 912 (Myco instrumentation, Renton, WA).

Para obter o valor percentual da hemoglobina glicada, foi utilizado o método de HPLC automatizado, com leitura no aparelho *G7 HPLC Analyzer* (Tosoh Bioscience, Maryland, EUA), enquanto a concentração plasmática do fibrinogênio foi obtida através do método de Klauss modificado, com leitura realizada no aparelho *Sysmex[®] CA-1500* (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, EUA).

Os índices de avaliação de resistência à insulina e disfunção das células beta, respectivamente, *Homeostatic Model Assessment – Insulin Resistance* (HOMA-IR) e *Homeostatic Model Assessment – β cells* (HOMA- β) (Matthews *et al.*, 1985), foram estimados pelas fórmulas: HOMA- β = 20 x insulina de jejum (μ U/mL) / glicemia de jejum (mmol/L) – 3,5.; HOMA-IR = glicemia de jejum (mmol/L) x insulina de jejum (μ U/mL) / 22,5.

3.4.3 Dosagem das proteínas séricas no soro

As amostras de soro dos indivíduos incluídos no estudo foram obtidas a partir do sangue total periférico colhido em tubo com ativador de coágulo e gel separador. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente, por 30 minutos, para coagularem e, em seguida, foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos a 25°C. O soro foi estocado a -20°C.

Para a dosagem de adiponectina, PAI-1 e resistina foi alcançada utilizando *MILLIPLEX™ Multiplex Map Human Adipokine Magnetic Bead Panel 1 kit* (Millipore, Missouri, EUA) e, para as dosagens IL-6, leptina e TNF- α , foi utilizado *MILLIPLEX™ Human Adipokine Magnetic Bead Panel 2 kit* (Millipore, Missouri, EUA) no equipamento LUMINEX® 200™ System (Luminex Corporation, Austin, EUA).

3.4.4 Extração microRNAs do soro e síntese do cDNA

Para extração dos miRNAs do soro, foi utilizado o conjunto de reagentes do *miRNeasy serum/plasma Kit™* (QIAGEN, GmbH, Hilden, Alemanha) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante modificado apenas adicionando de MS2 Carrier (MS2 RNA, Roche), no intuito de aumentar a captura de miRNAs (Andersen *et al.*, 2010) e *spike-in* (*C. elegans* miR-39) para o controle e normalização da qPCR. Todos os procedimentos técnicos foram realizados em condições livre de RNases.

A quantificação e a análise de pureza dos miRNAs das amostras foram realizadas utilizando o Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e o Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, EUA), respectivamente.

O cDNA foi sintetizado a partir dos miRNAs extraídos usando o conjunto de reagentes miScript II Reverse Transcription (Qiagen) e armazenado em -20°C até a etapa de RT-qPCR.

3.4.5 Análise do perfil de miRNA circulante pela PCR array

A expressão de miRNA do soro foram analisadas utilizando placa comercial denominada *Human miFinder 384HC miScript miRNA PCR Array* (código MIHS-3001Z, QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) que detecta perfil de

372 miRNAs cuja expressão é abundante na maioria dos tecidos e fluidos, e também são melhores caracterizados no registro do banco da miRBase (www.miRBase.org) e o sistema *QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A relação dos 372 miRNAs analisados encontra-se no site da QIAGEN (<https://www.qiagen.com/br/shop/pcr/primer-sets/miscript-mirna-pcr-arrays?catno=MIHS-3001Z#geneglobe>)

Os dados de expressão foram analisados usando o *miScript miRNA PCR Array Data Analysis software* (Qiagen, Hilden, Germany). A expressão relativa dos miRNAs foi medida pelo método de quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) ou *fold change* (Livak e Schmittgen, 2001), normalizado pela média global dos 372 miRNAs amplificados na PCR array, seguindo a categorização: Síndrome metabólica vs. Sem síndrome metabólica e Obesos vs. Peso normal.

Realizou-se o controle de qualidade das amostras de cDNA utilizando placa de *miScript miRNA QC PCR array* (código MIHS-989ZE-1, QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) que contém controle de 4 miRNAs (cel-miR-39-3p, cel-miR-16-5p, cel-miR-21-5p, cel-miR-191-5p), 3 non-coding RNA (SNORD 61, SNORD 95, SNORD 96A), miRTC (controle da transcrição reversa) e PPC (controle positivo da PCR) para cada amostra. Somente as amostras com a pureza e qualidade satisfatória foram utilizadas para o experimento da PCR array.

Os miRNAs com amplificação superior a 35 ciclos foram excluídos das análises e somente aqueles com $FC > 2$ e $p < 0,05$ entre os grupos Síndrome metabólica vs. Sem síndrome metabólica e Obesos vs. Peso normal foram selecionados (n=6 em cada grupo).

3.4.6 Expressão diferencial dos miRNAs selecionados na PCR array em pacientes com síndrome metabólica

Os cDNAs dos indivíduos (n=233) classificados em portadores de síndrome metabólica (n=89) e sem síndrome metabólica (n=144) foram utilizados para o estudo da expressão de miRNA através da *custom miScript miRNA PCR Array* (Cat. No. CMIHS02485E, QIAGEN, Hilden, Germany) e *Quant Studio 12K Flex Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Forest City, USA). O controle de qualidade das amostras de cDNA utilizando placa de

miScript miRNA QC PCR array (código MIHS-989ZE-1, QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) também foi utilizado.

A expressão dos miRNA foi medida usando o método de comparação de Ct (formula $2^{-\Delta Ct}$) normalizado pela média aritmética do miRNA endógeno (miR-191-5p, miR-21-5p e miR-16-5p) disponível em placas PCR e miRNAs amplificados com mais de 35 ciclos também foram excluídos da análise.

A curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foi construída, utilizando os valores de ΔCt (cycle threshold), para avaliar a sensibilidade e especificidade dos miRNAs como potenciais biomarcadores para síndrome metabólica.

3.4.7 Análise das vias moleculares dos miRNAs

A análise funcional e a avaliação da interação entre os miRNAs, os alvos, a obesidade e resistência à insulina foi realizada utilizando o programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA; *Ingenuity® Systems*, Califórnia, EUA).

O IPA é uma ferramenta computacional (*software*) que para análise de interações entre genes, doença e possíveis alvos, mostrando, de forma mais intuitiva, a relação do que se quer pesquisar (doença) com possíveis marcadores (biomarcadores) através de uma rede de interações. Dessa maneira, foi construída uma rede, na qual demonstramos as vias de possíveis ligações das moléculas de interesse com a obesidade, resistência à insulina e suas complicações.

3.4.8 Análise estatística

As estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS versão 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a distribuição dos dados das variáveis contínuas. As variáveis contínuas com distribuição normal foram apresentadas como média e desvio padrão e comparadas por teste t ou ANOVA One way seguida pelo pós-teste de Tukey. As variáveis contínuas sem distribuição normal foram apresentadas como mediana e intervalo interquartil e analisadas por testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. O teste de qui-quadrado foi utilizado para comparar a distribuição de variáveis categóricas. As correlações

de Spearman e Person foram realizadas entre todas as variáveis contínuas. Análise de regressão linear múltipla (*stepwise*) foi realizada para avaliar a influência da expressão sérica dos miRNAs diferentemente expressos (variável dependente) sob os parâmetros antropométricos, bioquímicos e inflamatórios. Para todas as análises estatísticas realizadas, foram considerados estatisticamente significativos os resultados cujos níveis descritivos (valores de p) foram inferiores a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Parâmetros clínicos, antropométricos e moleculares relacionados a obesidade

O perfil da frequência de gênero, etnia, tabagismo, consumo de bebida alcoólica e número de mulheres com menopausa foi semelhante entre obesos e não obesos ($p>0,05$; **Tabela 2**). No entanto, e como esperado, a prevalência de indivíduos com DM2 ($p=0,002$), resistência à insulina ($p<0,001$), hipertensão arterial ($p<0,001$) e histórico familiar de DCV ($p=0,008$) foi maior nos pacientes obesos em comparação aos não obesos e a prática de atividade física ($p<0,001$) menor nos obesos.

Tabela 2. Características sociodemográficas da população estudada

Variável		Peso Normal (47)	Sobrepeso (84)	Obeso (102)	<i>p</i> -valor
Gênero, %	Masculino	44,7 (21)	48,8 (41)	39,2 (40)	0,418
Etnia**, %	Branca	53,2 (25)	45,2 (38)	51,5 (52)	0,715
Tabagismo, %	Fumante	14,9 (7)	17,8 (15)	6,9 (7)	0,111
Diabete melito tipo 2, %		8,5 (4)	14,3 (12)	30,4 (31)	0,002
Resistência à insulina, %		0,0 (0)	25,0 (21)	100,0 (102)	<0,001
Hipertensão arterial, %		23,4 (11)	27,4 (23)	54,5 (55)	<0,001
História familiar de DCV, %		44,7 (21)	53,6 (45)	69,6 (71)	0,008
Prática de atividade física, %		53,2 (25)	22,6 (19)	26,7 (27)	<0,001
Consumo alcoólico, %		34,0 (16)	41,7 (35)	37,6 (38)	0,676
Menopausa, %		46,2 (12)	46,5 (20)	48,4 (30)	0,973

Nota: Número de indivíduos entre parênteses. Os indivíduos com $18,5 \leq \text{IMC} < 25\text{kg/m}^2$ foram classificados como peso normal, $25,0 \leq \text{IMC} < 30\text{kg/m}^2$ foram classificados como sobrepeso e $\text{IMC} \geq 30\text{kg/m}^2$ foram classificados como obesos. Variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado. $p<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. DCV: doença cardiovascular; **Etnia: autodeclaração dos participantes.

Na **Tabela 3** está representado os dados biodemográficos e antropométrico dos pacientes obesos e não obesos. Os valores de IMC, CA, RCQ, teor de gordura, taxa metabólica basal, total de água no corpo foram aumentadas nos pacientes obesos quando comparado com os pacientes não obesos ($p < 0,001$ para todos os parâmetros), indicando uma homogeneidade dos indivíduos categorizados nos grupos estudados.

Tabela 3. Dados biodemográficos e antropométrico dos indivíduos obesos, sobrepesos e com peso normal

Variável	Peso Normal (47)	Sobrepeso (84)	Obeso (102)	<i>p</i> -valor
Idade, anos	50,0(39,0-58,0)	48,5(37,8-56,0)	51,0(42,8-59,0)	0,178
IMC, kg/m²	23,0(20,9-24,4) ^a	27,5(26,3-28,7) ^b	33,3(31,2-35,8) ^c	<0,001
CA, cm	80,0(75,8-85,0) ^a	92,0(88,0-97,0) ^b	106,0(100,0-113,5) ^c	<0,001
RCQ	0,85(0,78-0,92) ^a	0,90(0,86-0,96) ^b	0,95(0,87-1,01) ^c	<0,001
Teor de gordura, %	27,8(23,4-30,8) ^a	31,2(26,4-36,2) ^b	37,3(33,1-41,9) ^c	<0,001
Taxa Metabólica Basal, cal/dia	1281(1140-1569) ^a	1506(1319-1787) ^b	1659(1478-1980) ^c	<0,001
Total de água no Corpo, L	31,3(27,5-39,1) ^a	35,6(31,3-43,4) ^b	39,3(34,6-47,6) ^c	<0,001
Massa magra, %	73,2(71,5-79,9) ^a	72,3(70,5-73,9) ^b	72,7(71,4-74,9) ^{a,b}	0,022

Nota: Número de indivíduos em parêntese. Os indivíduos com $18,5 \leq \text{IMC} < 25 \text{kg/m}^2$ foram classificados como peso normal, $25,0 \leq \text{IMC} < 30 \text{kg/m}^2$ foram classificados como sobrepeso e $\text{IMC} \geq 30 \text{kg/m}^2$ foram classificados como obesos. Variáveis contínuas são apresentadas como mediana e intervalo interquartil e foram comparadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. IMC: índice de massa corpórea; CA: circunferência abdominal; RCQ: relação cintura/quadril.

Os dados com as determinações bioquímicas e o perfil inflamatório estão representados na **Tabela 4**. O perfil glicídico mostrou-se alterado com valores de aumentados de glicemia ($p < 0,001$), hemoglobina glicada ($p = 0,002$), insulina ($p < 0,001$), refletindo no aumento dos valores de HOMA- β ($p < 0,001$) e HOMA-IR, ($p < 0,001$). Similarmente, o perfil lipídico também se mostrou alterado com valores aumentados da concentração de VLDLc ($p < 0,001$) e triacilgliceróis ($p < 0,001$) e valores reduzidos de HDLc ($p < 0,001$) e APOA1 ($p < 0,001$) nos pacientes obesos em comparação aos não obesos. Esses resultados reforçam que a obesidade está envolvida diretamente com os distúrbios metabólicos, sendo esse um dos critérios utilizados para a caracterização da síndrome metabólica.

Alguns marcadores inflamatórios séricos dos também está apresentado na tabela **Tabela 4**. Interessantemente, observou-se que os valores de PCR-us ($p = 0,002$), fibrinogênio ($p < 0,001$), TNF- α ($p < 0,001$), PAI-1 ($p < 0,001$) e IL-6 ($p < 0,001$) mostraram aumentos no grupo de obesos em comparação ao grupo de pacientes não obesos. Além disso, os valores das adipocinas, resistina ($p = 0,002$) e leptina ($p < 0,001$) também apresentaram elevados nos pacientes obesos comparados com não obesos, enquanto a adiponectina ($p < 0,001$) foi reduzida nestes pacientes. Esses resultados refletem a influência do aumento do teor de gordura e dos adipócitos na secreção de citocinas inflamatórias e adipocinas.

Para os demais parâmetros, exceto os leucócitos totais ($p < 0,001$), nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos estudados.

Tabela 4. Dados das determinações bioquímicas dos indivíduos peso normal, sobrepeso e obeso

Variável	Peso Normal (48)	Sobrepeso (84)	Obeso (103)	P
Eritrócito, 10 ⁶ /mm ³	4,95(4,66-5,28)	5,01(4,70-5,34)	4,94(4,68-5,37)	0,600
Hematócrito, %	43,3(40,4-47,4)	44,1(42,1-46,7)	42,7(40,7-45,8)	0,126
Plaquetas, Mil/mm ³	243,0(203,0-272,0)	253,5(208,3-290,8)	265,0(222,5-308,5)	0,112
Leucócito Total, Mil/mm ³	5,55(4,63-7,05)	6,35(5,41-8,12)	7,23(5,83-8,79)	<0,001
Uréia, mg/dL	34,0(26,0-39,0)	30,0(25,0-35,0)	31,0(25,0-39,0)	0,186
Creatinina, mg/dL	0,80(0,70-0,90)	0,80(0,70-0,98)	0,80(0,70-1,00)	0,729
Glicose, mg/dL	84,0(79,0-90,0) ^a	88,0(82,3-94,0) ^{a,b}	91,0(83,0-103,0) ^b	<0,001
Hemoglobina Glicada, %	5,6(5,4-5,9) ^a	5,7(5,6-6,0) ^{a,b}	5,8(5,6-6,5) ^b	0,002
Insulina, uIU/mL	3,62(2,74-5,37) ^a	6,87(5,05-9,70) ^b	10,63(8,11-14,83) ^c	<0,001
HOMA-β	63,2(45,5-107,4) ^a	100,1(58,6-165,6) ^b	135,7(95,0-189,3) ^c	<0,001
HOMA-IR	0,90(0,55-1,17) ^a	1,53(1,08-2,18) ^b	2,51(1,76-3,76) ^c	<0,001
Colesterol Total, mg/dL	204,0(180,0-224,0)	201,5(171,3-225,5)	201,0(171,8-231,5)	0,989
HDLc, mg/dL	63,0(50,0-78,0) ^a	50,0(41,0-57,0) ^b	46,0(38,8-53,0) ^b	<0,001
LDLc, mg/dL	119,0(91,8-138,6)	121,8(94,4-145,8)	125,4(94,7-147,0)	0,769

VLDLc, mg/dL	19,2(13,8-24,8) ^a	23,7(16,9-35,9) ^b	28,7(19,7-36,7) ^b	<0,001
Triacilgliceróis, mg/dL	96,0(69,0-124,0) ^a	118,5(84,3-179,3) ^b	143,5(98,3-183,3) ^b	<0,001
Apo AI, mg/dL	169,0(142,0-187,0) ^a	145,0(127,5-162,0) ^b	138,5(125,0-158,5) ^b	<0,001
Apo B, mg/dL	90,7(77,5-111,0)	102,5(81,3-123,8)	102,5(88,5-118,0)	0,098
PCR-us, mg/dL	0,50(0,50-1,00) ^a	0,70(0,50-1,00) ^{a,b}	0,85(0,50-1,30) ^b	0,002
Fibrinogênio, mg/dL	269,0(230,5-301,1) ^a	294,0(251,0-346,0) ^b	310,0(279,3-358,5) ^b	<0,001
TNF-α, pg/mL	3,16(1,90-4,58) ^a	4,01(2,66-5,29) ^{a,b}	4,70(3,37-6,15) ^b	0,003
IL-6, pg/mL	1,01(0,70-2,63) ^a	1,36(0,75-2,33) ^a	2,18(1,52-3,99) ^b	<0,001
PAI-1, ng/mL	68,4(50,9-83,7) ^a	83,5(60,9-109,2) ^a	101,0(73,7-136,9) ^b	<0,001
Resistina, ng/mL	27,2(16,3-36,6) ^a	30,9(18,3-47,9) ^a	38,7(25,9-62,4) ^b	0,002
Adiponectina, μg/mL	19,4(11,3-29,1) ^a	10,6(6,3-16,6) ^b	13,3(8,8-21,3) ^b	<0,001
Leptina, ng/mL	4,45(1,80-8,81) ^a	11,32(3,69-17,11) ^b	21,16(11,72-38,63) ^c	<0,001

Nota: Os indivíduos com $18,5 < \text{IMC} > 25\text{kg/m}^2$ foram classificados como peso normal, $25,0 < \text{IMC} < 30\text{kg/m}^2$ foram classificados como sobrepeso e $\text{IMC} > 30\text{kg/m}^2$ foram classificados como obesos. Variáveis contínuas são apresentadas como mediana e intervalo interquartil e foram comparadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. HDLc: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDLc: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDLc: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; ApoAI: Apolipoproteína AI; ApoB: Apolipoproteína B; PCR-us; Proteína C Reativa ultra-sensível; TNF- α ; fator de necrose tumoral alfa; IL-6: interleucina 6, PAI-1; Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1.

O perfil de expressão de miRNAs foi avaliado nos indivíduos obesos e não obesos (**Figura 5**). Observou-se o aumento da expressão de aproximadamente 2 vezes do miR-1224-5p ($p=0,034$), miR-181a-5p ($p=0,020$) e miR-139-3p ($p=0,027$), uma expressão aumentada de aproximadamente 3 vezes do miR-1224-3p ($p=0,044$), miR-195-3p ($p=0,047$), miR-27a-5p ($p=0,041$) e miR-346 ($p=0,010$), uma expressão aumentada de aproximadamente 4 vezes dos miR-1207-5p ($p=0,027$), miR-483-5p ($p=0,034$), miR-296-3p ($p=0,010$), um aumento da expressão de aproximadamente 5 vezes dos let-7g-2-3p ($p=0,001$) e miR-1-3p ($p=0,002$), e, uma expressão aumentada de aproximadamente 6 vezes do miR-95-3p ($p=0,003$) nos indivíduos obesos em comparação aos não obesos.

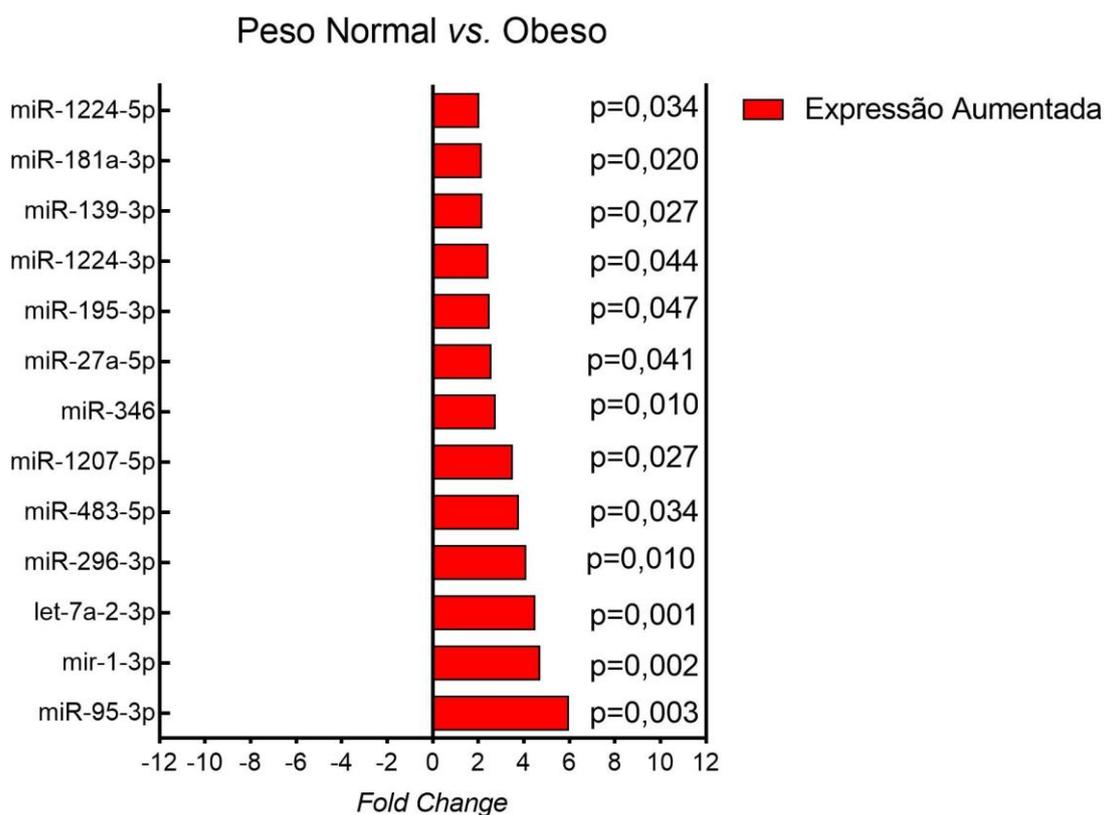


Figura 5. Expressão relativa dos miRNAs derivados do soro entre pacientes obesos e não obesos. Os dados são mostrados como *fold change* (FC) entre pacientes com obesidade vs. indivíduos com peso normal, normalizados pela média geométrica global de todos os 372 miRNAs testados na PCR array. Foram considerados somente valores de $FC > 2$ e o $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativos.

Os miRNAs diferentemente expressos obtidos no estudo foram selecionados para o estudo *in silico*, para avaliar os prováveis genes alvos, que são possíveis de interação com as sequências dos mRNAs. As **Tabela 5** e **Figuras 6 a 12** mostram resultados da análise de predição dos 13 miRs avaliados utilizando o software *Ingenuity Pathway Analysis*. Descritos resumidamente a seguir.

A predição dos genes alvos do miR-346 (**Figura 6A**), relacionados com vias metabólicas de interesse como obesidade, resposta inflamatória, doença hepática gordurosa não alcoólica, esteatose hepática, diabetes melito, distúrbio do metabolismo da glicose e doenças cardiovasculares indicaram 25 alvos regulados pelo miRNA. Para o miR-483-5p (**Figura 6B**), 18 mRNAs alvos foram preditos, também se relacionando a vias envolvidas em doença hepática gordurosa não alcoólica, infarto agudo do miocárdio, hipertensão, distúrbio do metabolismo da glicose, diabetes melito e resposta inflamatória. As vias de regulação do miR-181a-5p (**Figura 7A**) caracteriza a modulação da expressão de 28 mRNAs alvos associados a cardiotoxicidade, infarto do miocárdio e eventos inflamatórios. O aumento da expressão do miR-1207-5p (**Figura 7B**) pode estar influenciando em 81 mRNA que foram associados com infarto do miocárdio, obesidade e diabetes melito. O miR-139-3p (**Figura 8A**) apresentou 18 mRNAs alvos que são genes da vias da resposta inflamatória, infarto do miocárdio, diabetes melito, distúrbio do metabolismo da glicose, doença hepática gordurosa não alcoólica e esteatose hepática. O miR-296-3p (**Figura 8B**) regula 14 mRNAs de genes alvos, os quais estão relacionados com obesidade, infarto agudo de miocárdio, resposta inflamatória, diabetes melito e esteatose hepática. O miR-1224-3p (**Figura 9A**) pode regular 23 mRNAs de genes alvos aqui preditos, que mostraram também estar relacionados com vias de sinalização mediadas por citocinas e quimiocinas, obesidade, esteatose hepática, infarto do miocárdio, resistência a insulina, hipertensão, distúrbio do metabolismo da glicose e massa de tecido adiposo. A expressão do miR-1-3p (**Figura 9B**) pode estar associada a inibição de 25 mRNAs alvos relacionados com DCV, diabetes melitos e esteatose hepática. O miR-1224-5p (**Figura 10A**) pode regular 3 mRNAs de genes alvos, que podem está envolvidos com DCV. O miR-95-3p (**Figura 10B**) regula 3 mRNAs de genes alvos relacionados com

resposta inflamatória. O miR-27a-5p (**Figura 11A**) apresentou 51 mRNAs alvos preditos e relacionados com doenças e funções como infarto agudo do miocárdio, obesidade, resposta inflamatória, hipertensão, diabetes melito, distúrbio do metabolismo da glicose, aterosclerose, cardiotoxicidade, esteatose hepática. O let-72-2-3p (**Figura 11B**) e o miR-195-3p (**Figura 12A**) regulam apenas 4 mRNAs alvos cada um, porém os alvos estão envolvidos na gênese de importantes doenças como infarto do miocárdio, cardiotoxicidade, diabetes melito e esteatose hepática.

Tabela 5. mRNAs alvos preditos dos miRNAs diferentemente expressos em pacientes obesos e as supostas vias relacionadas com doenças metabólicas.

miRNA	mRNA alvos	Vias metabólicas/doenças
miR-346	<i>ARG2, BCL2, CCL2, CDC42, CXCR4, EDN1, EGFR, ESR1, F2, FN1, GNA12, HSPD1, IGF1, ITGA2B, KRAS, LYZ, MEF2A, MYLK, PDE7A, PKLR, PPP2R2B, PRKCE, SLC8A1, THBS1 e TTR</i>	Aterosclerose, Diabetes melito, Esteatose Hepática, Resposta inflamatória, Infarto do miocárdio e Doença hepática gordurosa não alcoólica
miR-483-5p	<i>ADRA2C, AQP7, CASP8, CYP7A1, F2R, GRB2, GRK2, HNF4A, IFIT3, IL12B, LEP, MAP2K3, MAPK1, MAPK3, MAPKAPK2, PDGFRA, RHOA e SERPINE1</i>	Doença hepática gordurosa não alcoólica, Infarto agudo do miocárdio, Hipertensão, Distúrbio do metabolismo da glicose, Diabetes melito e Resposta inflamatória
miR-181a-5p	<i>ACSL4, ADRA1A, BCL2, ELOVL2, ESR1, FAZ, FASLG, FLT1, GATA6, HSP90B1, HSPA1L, IL1A, IL2, KRAS, MAP3K3, PLCL2, PLPP3, PPP1R3C, PPP3R1, PRKAA2, PRKAG2, PRKCD, RPS6KB1, TGFBR2, TNF, TNFRSF11B, TNFSF11 e TRA</i>	Cardiotoxicidade, Diabetes melito, Distúrbio do metabolismo da glicose, Esteatose hepática, Infarto e Doença hepática gordurosa não alcoólica
miR-1207-5p	<i>ABCC8, ACAA2, AKT2, C2, CACNA2D1, CACNB1, CACNB3, CACNB4, CAV1, CD3E, CD86, CHRM1, CHRNA4, CHRNA6, CHRN1, CHRN2, CHRN3, CHRN4, CHRNE, CSF1, ECHS1, EGFR, ESR1, FASN, FGFR1, GNA11, GNAO1, GNB3, HNF1A, HSPG2, IFIT3, IFITM3, IGF1, IGF1R, IKBKG, IL1RN, IL6ST, IRF1, ITGB3,</i>	Infarto agudo do miocárdio, Diabetes melito, Esteatose hepática, Resposta inflamatória e Obesidade

	<i>KCNJ11, MAFA, MAP3K3, MAPKAPK2, MTOR, MYD88, NFATC4, NGF, NGFR, NOS1, PDE4B, PDGFB, PDGFRB, PDX1, PGF, PIK3CG, PLA2G2D, PLA2G2E, PLA2G6, PLPP3, POMC, PRKAR1B, PRKCD, RELA, SDC1, SERPING1, SIGIRR, SLC27A1, SMAD7, SRC, TGFBR2, THEM5, TLR6, TNF, TNFRSF11A, TNFRSF12A, TNFRSF1B, TNFSF14, TP53, TPSAB1/TPSB2, TRAF3 e VDR</i>	
miR-139-3p	<i>AGPAT1, CACNA1E, ELOVL2, FADD, GNA12, HLA-A, HLA-C, HLA-DOB, MAP2K3, NOS1, PDGFB, PNPLA3, PRKCQ, RUNX3, SDC1, SERPINE1, SLC2A2 e SMAD3</i>	Diabetes melitos, Distúrbio do metabolismo da glicose, Esteatose hepática, Resposta inflamatória, Infarto do miocárdio e Doença hepática gordurosa não alcoólica
miR-296-3p	<i>AQP5, CASP8, CCR3, CD14, CD40LG, CXCL8, HLA-DOA, HLA-DRB5, ICAM1, IL6ST, NGFR, PPP3R2, SMURF2 e VEGFB</i>	Infarto agudo do miocárdio, Diabetes melito, Esteatose hepática e Resposta inflamatória
miR-1224-3p	<i>ADIPOR2, AGPAT1, AQP7, CASP8, CD86, CHRM1, CHRM2, CHRNA2, CHRNB1, DHCR24, IL36RN, IL6R, IL6ST, KCNJ11, LEP, MAPK13, MMP9, MYD88, OSM, SMAD1, SP1, TNFRSF11A e VDR</i>	Distúrbio do metabolismo da glicose, Esteatose hepática, Hipertensão, Resistência à insulina, Infarto do miocárdio, Obesidade, Massa de tecido adiposo e Vias de sinalização mediadas por citocinas e quimiocinas
miR-1-3p	<i>ARG2, BCL2, CCL2, CDC42, CXCR4, EDN1, EGFR, ESR1, F2, FN1, GNA12, HSPD1, IGF1, ITGA2B, KRAS, LYZ, MEF2A, MYLK, PDE7A, PKLR, PPP2R2B, PRKCE, SLC8A1, THBS1 e TTR</i>	Infarto agudo do miocardio, Aterosclerose, Diabetes melito, Esteatose hepática e Resposta inflamatória

miR-1224-5p	<i>ATP4A, AMY2B e AMY2A</i>	Infarto do miocárdio e Morte cardíaca
miR-95-3p	<i>CD247, PDE4A e TRAF3</i>	Resposta inflamatória
miR-27a-5p	<i>ADRB1, AQP9, ARHGEF15, BCL2, CACNA1I, CACNA2D2, CALM1, CASP8, CD40LG, CD80, CHRM3, CRP, CXCR4, CYP19A1, EGFR, FLT1, FOXO1, GNAO1, GNAZ, GRB2, GUCY1B1, HADHA, HLA-DRB5, IKBKG, IL1R1, IL2, ITGA4, LIPG, LTA, MAP3K3, MAPK14, MYL12B, PDE6B, PDE7A, PDE8A, PIK3CG, PLA2G6, PMEPA1, PPP2R2A, PRF1, PRKG1, PRLR, PTPN2, RALB, RBP5, RHOA, SMPD1, SPTLC1, TGFB1, TPSAB1/TPSB2 e UBE2N</i>	Infarto agudo do miocárdio, Aterosclerose, Cardiotoxicidade, Diabetes melito, Distúrbio do metabolismo da glicose, Esteatose hepática, Hipertensão, Infarto do miocardio, Resposta inflamatória, Doença hepática gordurosa não alcoólica e Obesidade
let-7a-2-3p	<i>ADRA1A, BCL2, FOXO1 e PPP3R1</i>	Infarto do miocárdio, Cardiotoxicidade, Diabetes melito e Esteatose hepática
miR-195-3p	<i>ACADM, ADRA1A, CASP3 e PDE3B</i>	Cardiotoxicidade, Infarto do miocárdio, Esteatose hepática e Diabetes melito

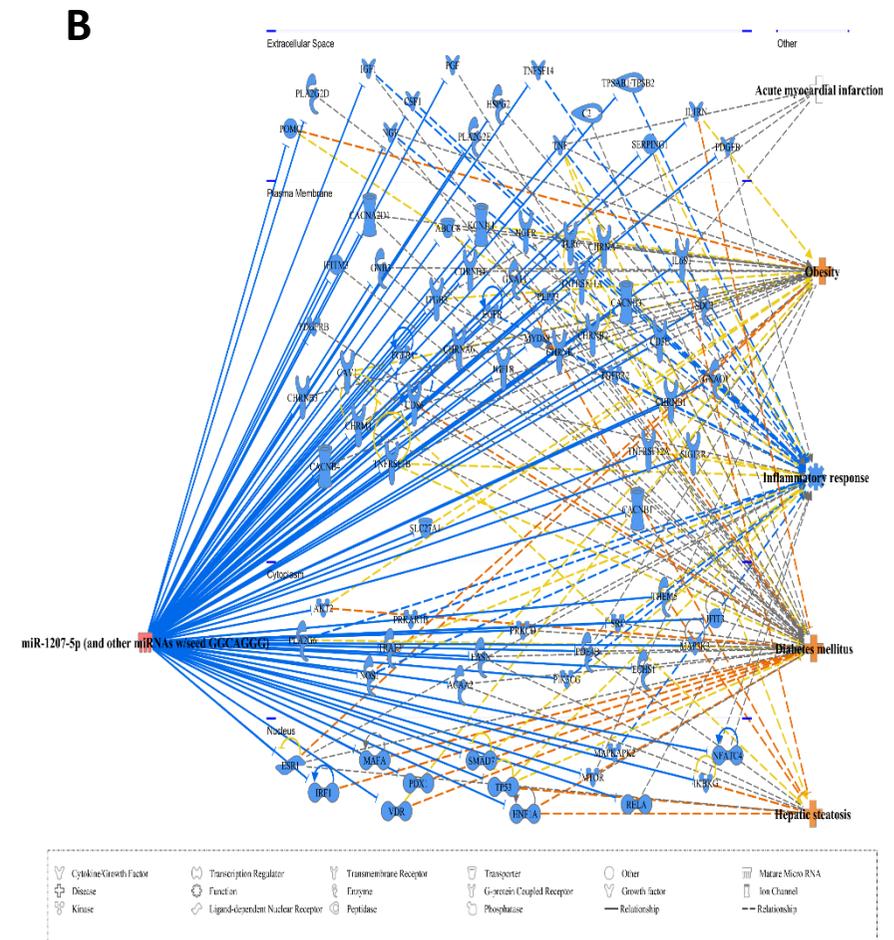
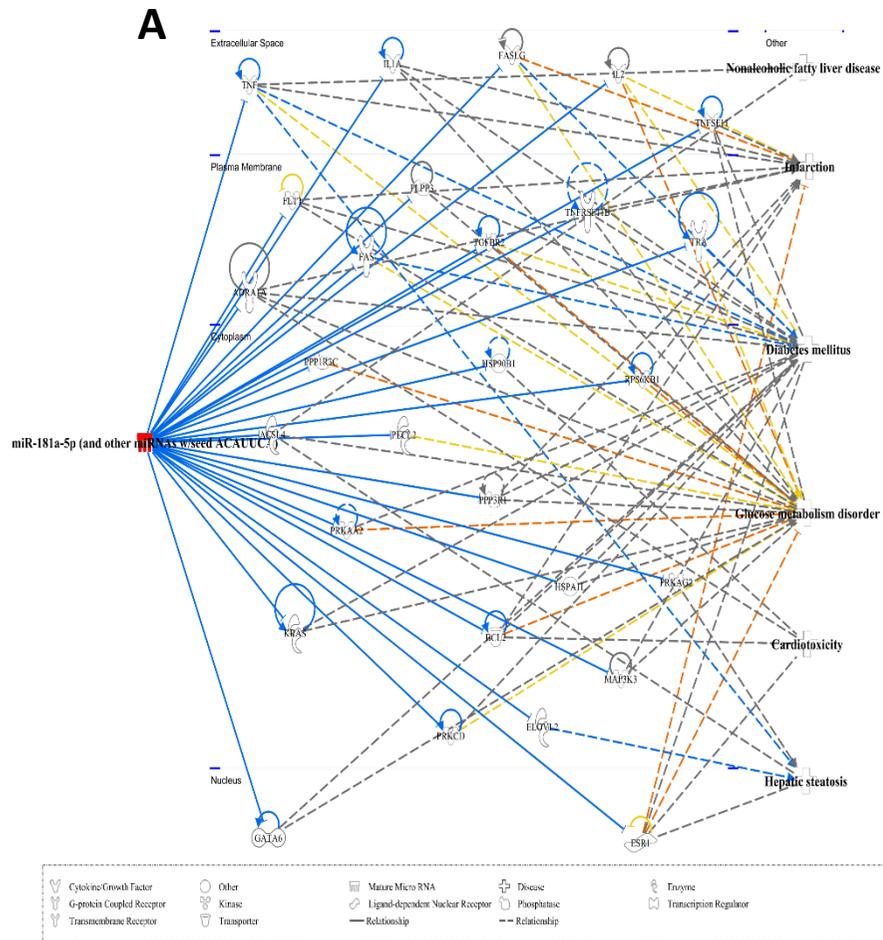


Figura 7. Identificação das prováveis vias de interação de miR-181a-5p (A) e do miR-1207-5p (B) com os mRNAs e supostos envolvimento com doenças metabólicas. Estudo de predição das vias regulatórias foram realizadas utilizando a ferramenta *Ingenuity Pathways Analysis*.

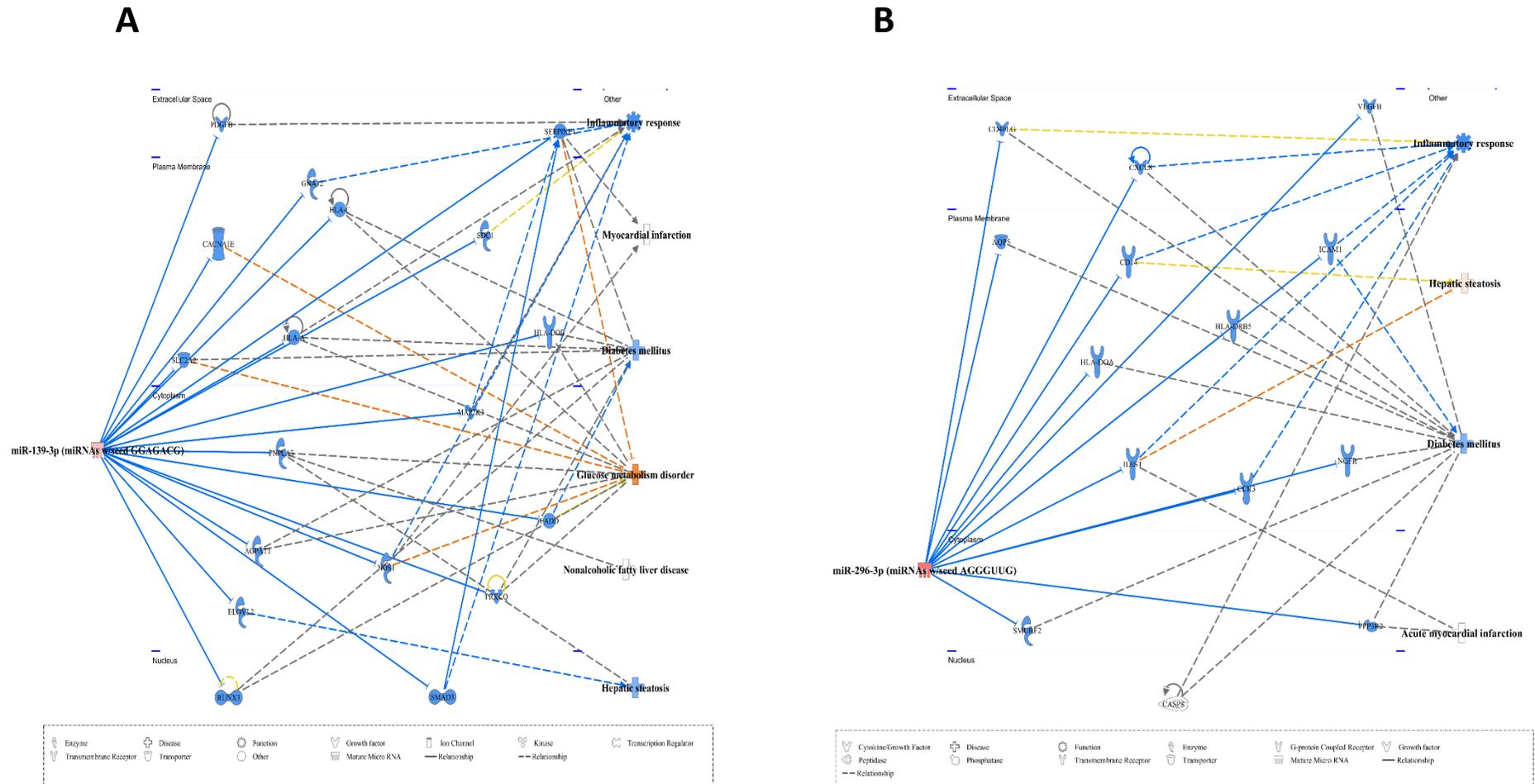


Figura 8. Identificação das prováveis vias de interação de miR-139-3p (A) e do miR-296-3p (B) com os mRNA e supostos envolvimento com doenças metabólicas. Estudo de predição das vias regulatórias foram realizadas utilizando a ferramenta *Ingenuity Pathways Analysis*.

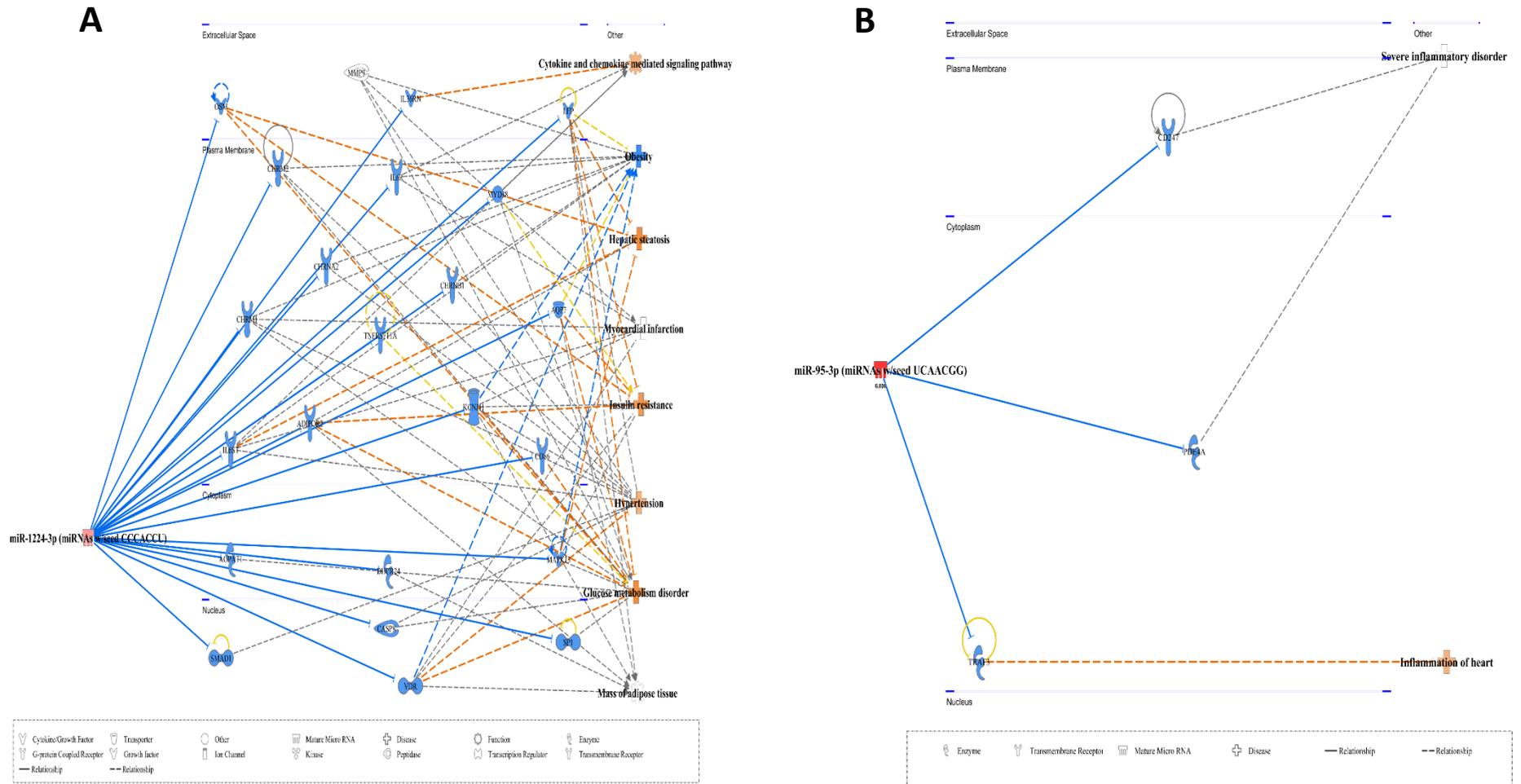


Figura 9. Identificação das prováveis vias de interação de miR-1224-3p (A) e do miR-95-5p (B) com os mRNA e supostos envolvimento com doenças metabólicas. Estudo de predição das vias regulatórias foram realizadas utilizando a ferramenta *Ingenuity Pathways Analysis*.

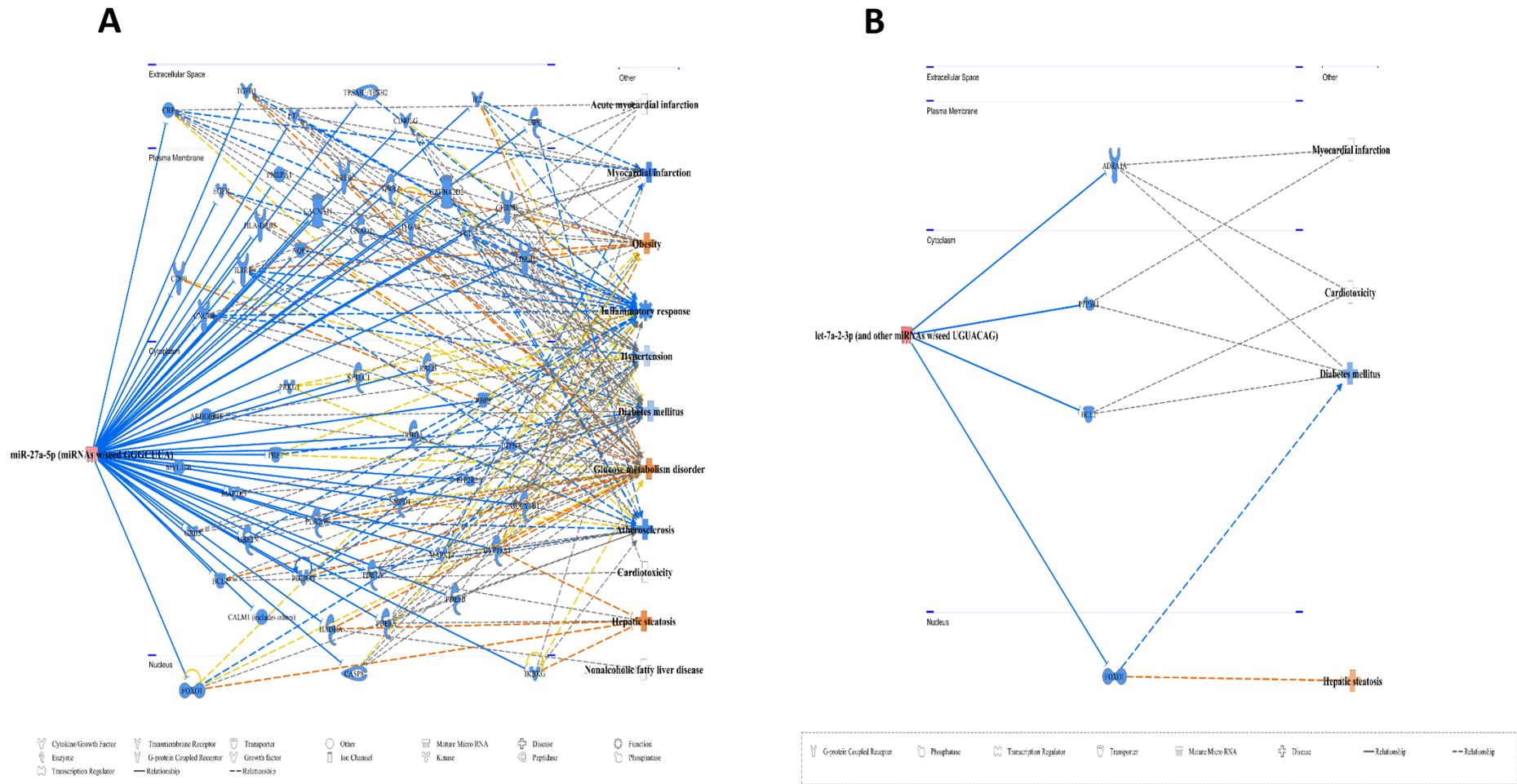


Figura 10. Identificação das prováveis vias de interação de miR-27a-5p (A) e do miR-7a-2-3p (B) com os mRNA e supostos envolvimento com doenças metabólicas. Estudo de predição das vias regulatórias foram realizadas utilizando a ferramenta *Ingenuity Pathways Analysis*.

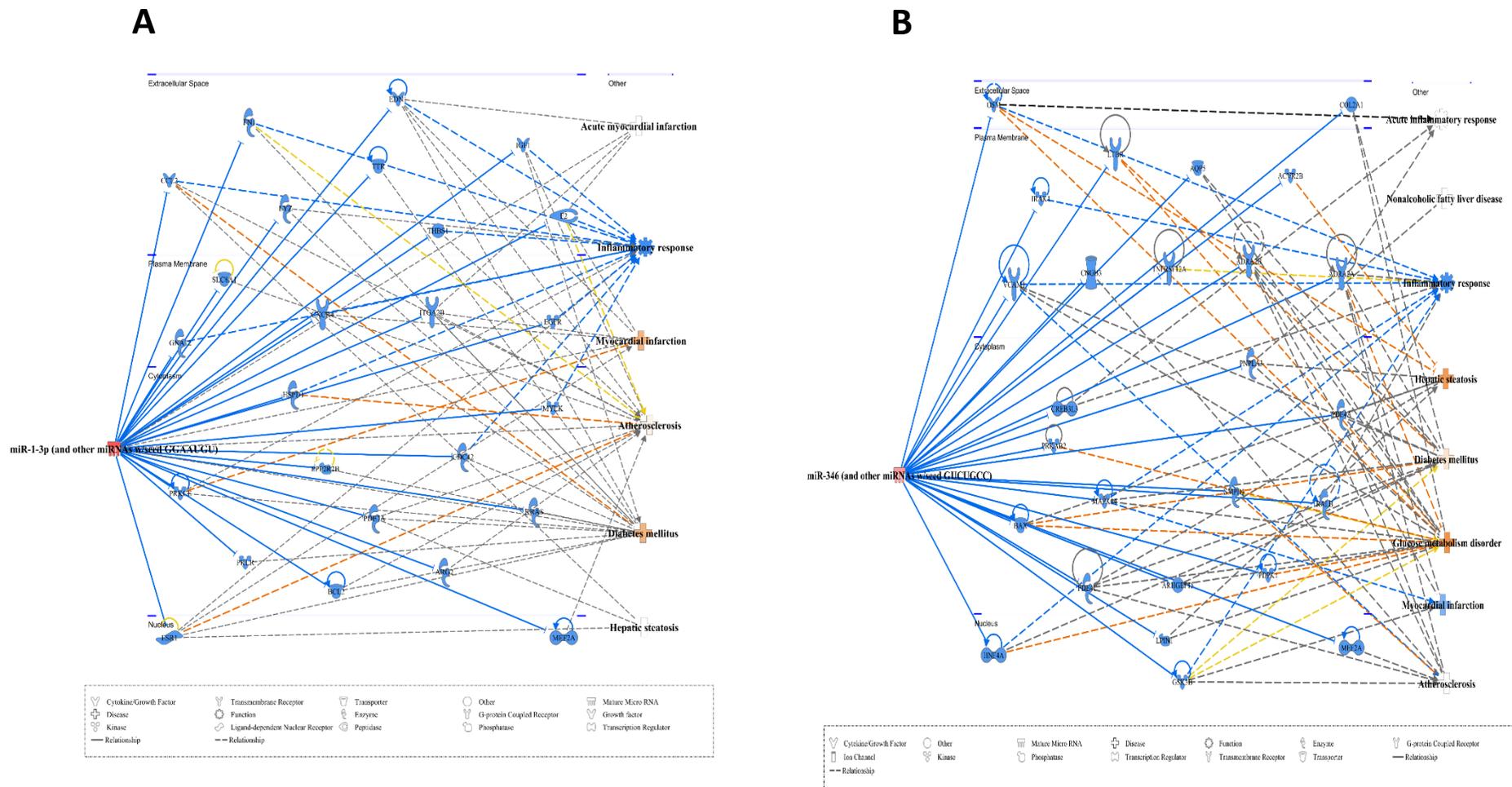


Figura 11. Identificação das prováveis vias de interação de miR-1-3p (A) e miR-346 (B) com os mRNA e supostos envolvimento com doenças metabólicas. Estudo de predição das vias regulatórias foram realizadas utilizando a ferramenta *Ingenuity Pathways Analysis*.

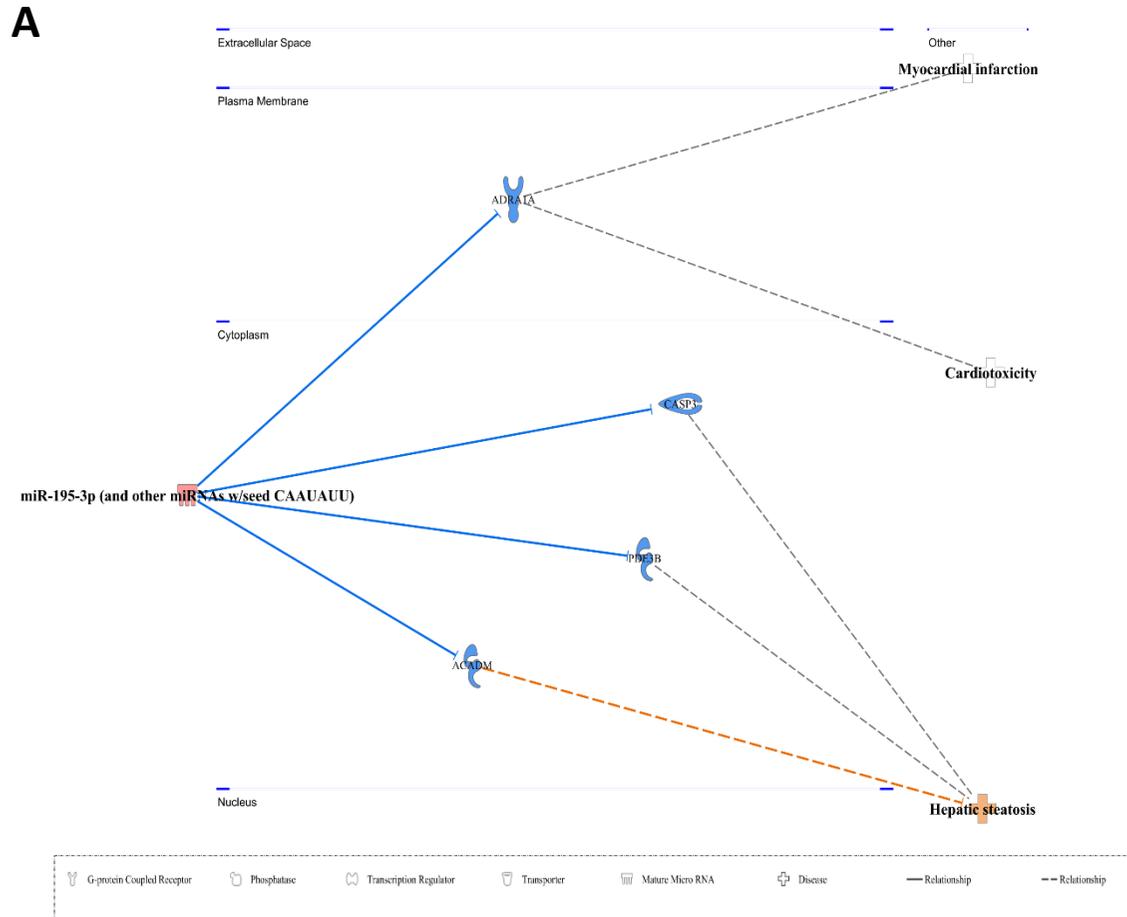


Figura 12. Identificação das prováveis vias de interação de miR-195-3p (A) com os mRNA e supostos envolvimento com doenças metabólicas. Estudo de predição das vias regulatórias foram realizadas utilizando a ferramenta *Ingenuity Pathways Analysis*.

4.2. Parâmetros clínicos e moleculares relacionados à resistência à insulina

Na **Tabela 8**, estão representadas as determinações bioquímicas dos pacientes com e sem resistência à insulina. Assim como observado para os pacientes obesos, o perfil glicídico mostrou-se alterado com valores aumentados de glicemia, hemoglobina glicada, insulina, refletindo no aumento dos valores de HOMA- β e HOMA-IR no grupo com de pacientes com resistência à insulina em comparação com aqueles sem diagnóstico de resistência à insulina ($p < 0,001$ para todos os parâmetros). Para o perfil lipídico, também foi observado valores aumentados da concentração de VLDLc ($p < 0,001$) e triglicerídeos ($p < 0,001$) e valores reduzidos de HDLc ($p < 0,001$) e APOA1 ($p < 0,001$) nos pacientes com resistência à insulina em comparação com aqueles sem a desordem metabólica.

Em relação ao perfil inflamatório dos pacientes com resistência à insulina (**Tabela 6**), observou-se que os valores de PCR-us ($p = 0,045$), fibrinogênio ($p < 0,001$), TNF- α ($p < 0,001$), PAI-1 ($p < 0,001$) e IL-6 ($p < 0,001$) foram aumentados nos pacientes portadores da desordem em comparação ao grupo de pacientes não portadores. Além disso, os valores das adipocinas, resistina ($p = 0,004$) e leptina ($p < 0,001$), também foram aumentados nos pacientes com resistência à insulina. Esses resultados refletem a similaridade entre o perfil metabólico na obesidade e resistência à insulina, caracterizados pelo aumento da secreção de citocinas inflamatórias e adipocinas.

Tabela 6. Dados das determinações bioquímicas dos indivíduos sem e com resistente à insulina

Variável	Sem RI (110)	RI (123)	<i>p</i>-valor
Eritrócito, 10⁶/mm³	5,00 (4,66-5,28)	4,96 (4,69-5,36)	0,834
Hematócrito, %	43,9 (41,3-46,9)	43,1 (40,7-45,9)	0,230
Plaquetas, Mil/mm³	247,5 (207,3-288,0)	263,0 (217,3-305,8)	0,139
Leucócito Total, Mil/mm³	6,00 (4,96-7,61)	7,22 (5,77-8,63)	<0,001
Uréia, mg/dL	31,0 (25,0-36,0)	31,0 (25,0-38,0)	0,403
Creatinina, mg/dL	0,80 (0,70-0,90)	0,80 (0,70-1,00)	0,205
Glicose, mg/dL	85,5 (80,0-91,0)	92,0 (84,0-103,0)	<0,001
Hemoglobina Glicada, %	5,7 (5,4-5,9)	5,9 (5,6-6,5)	<0,001
Insulina, uIU/mL	5,31 (3,19-7,35)	10,30 (7,66-14,64)	<0,001
HOMA-β	89,72 (53,01-133,70)	131,20 (88,55-186,10)	<0,001
HOMA-IR	1,14 (0,69-1,57)	2,29 (1,69-3,71)	<0,001
Colesterol Total, mg/dL	202,5 (175,8-224,0)	200,0 (171,0-231,0)	0,678
HDL-C, mg/dL	54,5 (45,0-68,0)	46,0 (38,8-53,0)	<0,001

LDL-C, mg/dL	120,6 (95,3-145,4)	121,0 (92,7-147,0)	0,756
VLDL-C, mg/dL	21,8 (15,1-27,6)	28,2 (19,2-36,8)	<0,001
Triacilglicerois, mg/dL	109,0 (75,3-137,8)	141,0 (96,0-184,0)	<0,001
Apo AI, mg/dL	155,0 (134,0-175,0)	137,0 (125,0-158,0)	<0,001
Apo B, mg/dL	96,4 (80,5-114,3)	103,0 (86,2-118,0)	0,223
PCR-us, mg/dL	0,70 (0,50-1,00)	0,80 (0,50-1,3)	0,045
Fibrinogênio, mg/dL	278,7 (238,8-323,5)	310,0 (275,9-359,3)	<0,001
TNF-α, pg/mL	3,58 (2,16-5,10)	4,55 (3,39-6,00)	<0,001
IL-6, pg/mL	1,11 (0,70-2,21)	2,03 (1,28-3,66)	<0,001
PAI-1, ng/mL	75,6 (56,5-101,0)	95,8 (71,0,-131,3)	<0,001
Resistina, ng/mL	29,4 (17,3-43,8)	36,2 (25,2-58,8)	0,004
Adiponectina, μg/mL	15,1 (8,5-23,7)	12,6 (7,9-18,9)	0,098
Leptina, ng/mL	5,94 (2,79-14,15)	18,25 (11,18-35,74)	<0,001

Nota: Variáveis contínuas são apresentadas através da mediana e intervalo interquartil e foram comparados pelo Mann-Whitney U-test. p-valor<0,05 foi considerado estatisticamente significativo. HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; ApoAI: Apolipoproteína AI; ApoB: Apolipoproteína B; PCR-us; Proteína C Reativa ultra-sensível, RI: resistência à insulina. TNF- α ; fator de necrose tumoral alfa; IL-6: interleucina 6, PAI-1; Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1.

O perfil de expressão de miRNAs também foi avaliado nos indivíduos com e sem resistência à insulina (**Figura 13**). Observou-se o aumento da expressão em aproximadamente 2 vezes do miR-193a-3p ($p=0,005$), miR-346 ($p=0,019$), miR-95-3p ($p=0,019$), miR-499a-5p ($p=0,049$), miR-1224-3p ($p=0,012$) e miR-1913 ($p=0,014$), uma expressão aumentada em aproximadamente 3 vezes do miR-181c-3p ($p=0,005$), miR-483-5p ($p=0,020$) e miR-30a-3p ($p=0,008$), um aumento de expressão em aproximadamente 4 vezes do miR-296-3p ($p=0,008$) e de cerca de 6 vezes do miR-92a-3p ($p=0,040$) nos indivíduos com resistência à insulina em comparação aos sem resistência.

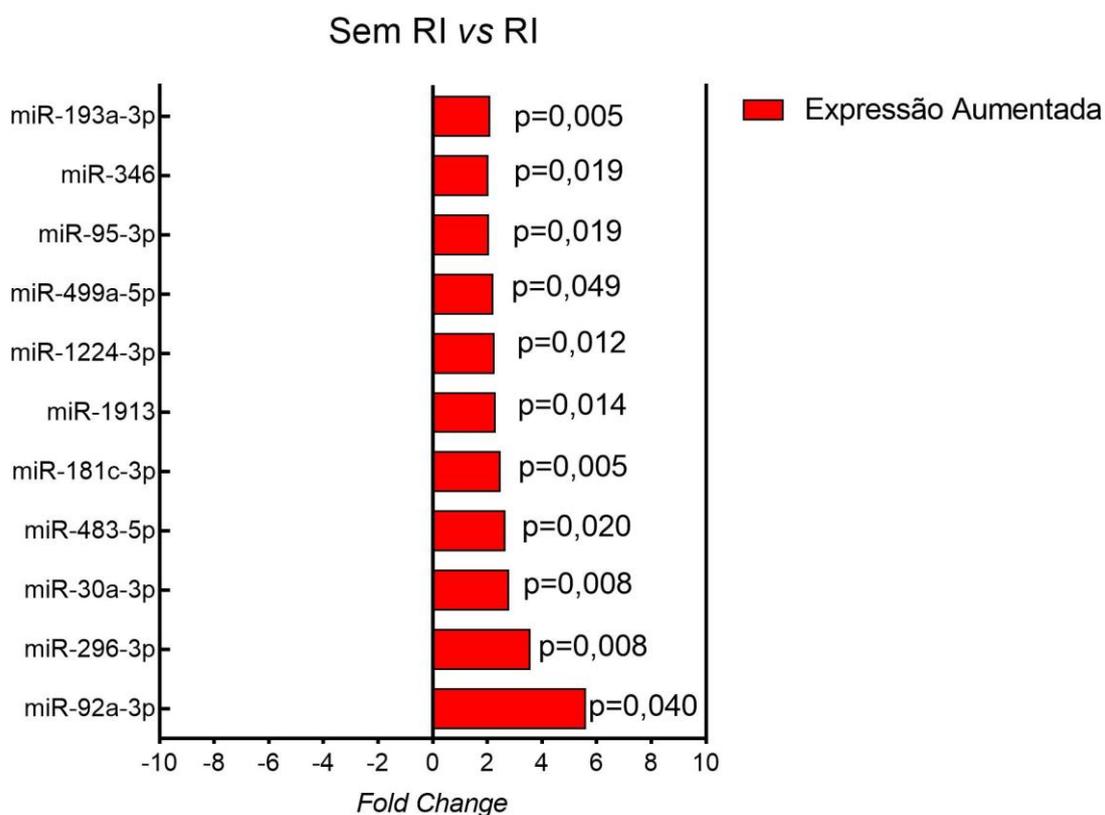


Figura 13. Expressão relativa dos miRNAs derivados do soro entre pacientes com e sem resistência à insulina. Os dados são mostrados como *fold change* (FC) entre pacientes com obesidade vs. indivíduos com peso normal, normalizados pela média geométrica global de todos os 372 miRNAs testados na PCR array. Foram considerados somente valores de $FC > 2$ e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativos. RI: Resistencia à insulina.

Vale ressaltar que os miRNAs 346 (**Figura 6A**), 483-5p (**Figura 6B**), 296-3p (**Figura 8B**), 1224-3p (**Figura 9A**) e 95-3p (**Figura 10B**) também foram observados com expressão aumentada nos pacientes obesos, indicando seu papel também na resistência à insulina, tanto relacionado ao desequilíbrio do perfil inflamatório e de adipocinas, bem como com risco de DCV e hepáticas, como a aterosclerose e esteatose hepática não alcoólica.

Os demais miRNAs, também foram utilizados para análise *in silico* e estão apresentados na **Tabela 7** e **Figuras 14 a 16**. A expressão aumentada do miR-92a-3p (**Figura 14A**), por predição, pode regular 41 mRNAs que estão envolvidos em vias relacionadas a ocorrência do infarto do miocárdio. O miR-193a-3p (**Figura 14B**) apresentou 58 mRNAs alvos preditos que estão relacionados com vias da resposta inflamatória, obesidade, distúrbio do metabolismo da glicose, infarto do miocárdio e cardiotoxicidade. O miR-181c-3p (**Figura 15A**), por predição, regula 3 mRNAs de genes alvos relacionados com DCV e inflamação. A predição para o miR-1913 (**Figura 15B**), mostrou que ele pode regular 67 mRNAs de genes alvos atribuídos a vias de regulação de DCV, diabetes melito e resistência à insulina, inflamação e obesidade. O miR-30a-3p (**Figura 16A**) apresentou, por predição, 42 mRNAs alvos relacionados com inflamação, diabetes, obesidade e DCV. A análise de predição do miR-499-5p (**Figura 16B**) mostrou influencia metabólica em 20 mRNAs alvos que estão envolvidos na regulação da resposta inflamatória, obesidade e infarto do miocárdio., hipertensão, resposta inflamatória, obesidade e esteatose hepática.

Mediantes os resultados encontrados, objetivamos aplicar as análises para a síndrome metabólica, que compreende uma desordem metabólica mais complexa e que inclui em seus critérios de diagnóstico componentes relacionadas a obesidade (circunferência abdominal) e a resistência à insulina (diabetes).

Tabela 7. mRNAs alvos preditos dos miRNAs diferentemente expressos em pacientes com resistência à insulina e as supostas vias relacionadas com doenças metabólicas.

miRNA	mRNA alvos	Vias metabólicas/doenças
miR-92a-3p	<i>ADM, ADRB1, ARHGEF10, BCL2L11, BMPR2, CACNA1I, CACNA2D1, CCL13, CDC42, CHRM2, CHRM5, CREB1, CXCL5, DNAJB12, DNAJB9, DUSP1, EIF1, FASLG, IFITM1, IL6ST, IRS2, ITGA5, ITGAV, ITGB3, ITPR1, MAP2K4, MSR1, MYLK, PDE10A, PDE4D, PIK3CB, PMEPA1, PRKAR1B, PRKCE, PTEN, SIRPA, SLC9A1, SMAD7, SOCS5, TRAF3 e TSC1</i>	Esteatose hepática, Resposta inflamatória, Hipertensão, Infarto do miocárdio e Obesidade
miR-193a-3p	<i>ADRA2B, ALOX5, AMBP, APOA2, AQP7, ARHGEF15, ARHGEF6, ATG7, BCL2L1, CACNA2D2, CBL, CCND1, CHRN1, CIITA, CLOCK, DNAJB9, ESR1, ETS1, FGF1, FN1, GNAO1, GRB10, HAVCR2, HLA-DOA, ICOS, IRF1, IRS2, ITGB3, JAK2, KCNJ11, KRAS, LIF, MAP3K3, MAPK10, MCL1, MMP14, MMP19, MMP8, MPO, MYLK, NFATC3, NFATC4, NGFR, NOS1, NOTCH2, OSM, OSMR, PDX1, PLAU, PRKAB1, PSEN1, PTEN, SOCS3, TCF7L2, TGFB2, TNFRSF14, TNFRSF1B e VAV3</i>	Cardiotoxicidade, resposta inflamatória, Distúrbio do metabolismo da glicose, Infarto do miocárdio e Obesidade
miR-181c-3p	<i>IL27, LIF e VAV3</i>	Cardiotoxicidade, Doença crônica inflamatória e Infarto do miocárdio
miR-1913	<i>ADRA1A, AKAP13, AKT2, AQP1, AQP7, ASIC1, BCL2L11, BIRC3, BSCL2, CALCRL, CHRNA2, CREB3L3, CSNK1D, CXCR1, CYP19A1, DUSP1, EP300, FADD, FASLG, FCER2, FOXO1, FOXP3, GNA11, GNAI3, GNAZ, GZMB, HDAC4, HNF1A, ICOSLG/LOC102723996, IL10RA, IL11, IL13, IL17A, IL24, IL2RA, INPPL1, KCNH2, LEP,</i>	Aterosclerose, Cardiotoxicidade, Diabetes melito, Distúrbio do metabolismo da glicose, Resistência à insulina, Infarto do miocárdio, Doença hepática gordurosa não alcoólica,

	<i>LGALS9, LIF, MAPKAPK2, MMP14, NFKBIB, PDE3B, PDE4B, PDE4C, PDE7B, PDGFB, PGF, PIK3R1, PLAT, RXRB, SELE, SELPLG, SERPINF2, SH2B1, SH2B3, SMAD7, SYK, TLR5, TNFRSF12A, TNFRSF1B, TNFSF13B, TRADD, VASP, VDR e ZBTB12</i>	Resposta inflamatória e Obesidade
miR-30a-3p	<i>ACSL4, AKT3, CAV1, CCL13, CCL7, CCR7, CDKN1B, CHRM2, CHRM3, CHUK, CREB1, CXCL11, EGR1, EIF1, EPO, HBEGF, HLA-B, HLA-DPB1, HMGB1, HSPD1, ICOS, IL1B, IL22RA2, IL33, ITGAV, ITPR2, MAPK13, NODAL, NOX3, PDE5A, PRKAA2, PRKAB2, PRLR, PTEN, RALB, RYR3, SLC12A1, TGFA, THBS1, TNFSF13B, UBE2G1 e UBE2K</i>	Doença inflamatória crônica, Diabetes melito, Distúrbio do metabolismo da glicose, Infarto do miocárdio, Resposta inflamatória, Doença hepática gordurosa não alcoólica e Obesidade
miR-499-5p	<i>CACNB2, CXCL10, CXCL11, CXCL6, FGF2, GATA3, IKBKB, IL1RL1, IL23A, IL31, IL33, MAF, MBL2, MYLK, NOCT, PPP3CA, PRKAA1, STAT1, TIMD4 e VAV3</i>	Infarto do miocárdio, Resposta inflamatória e Obesidade

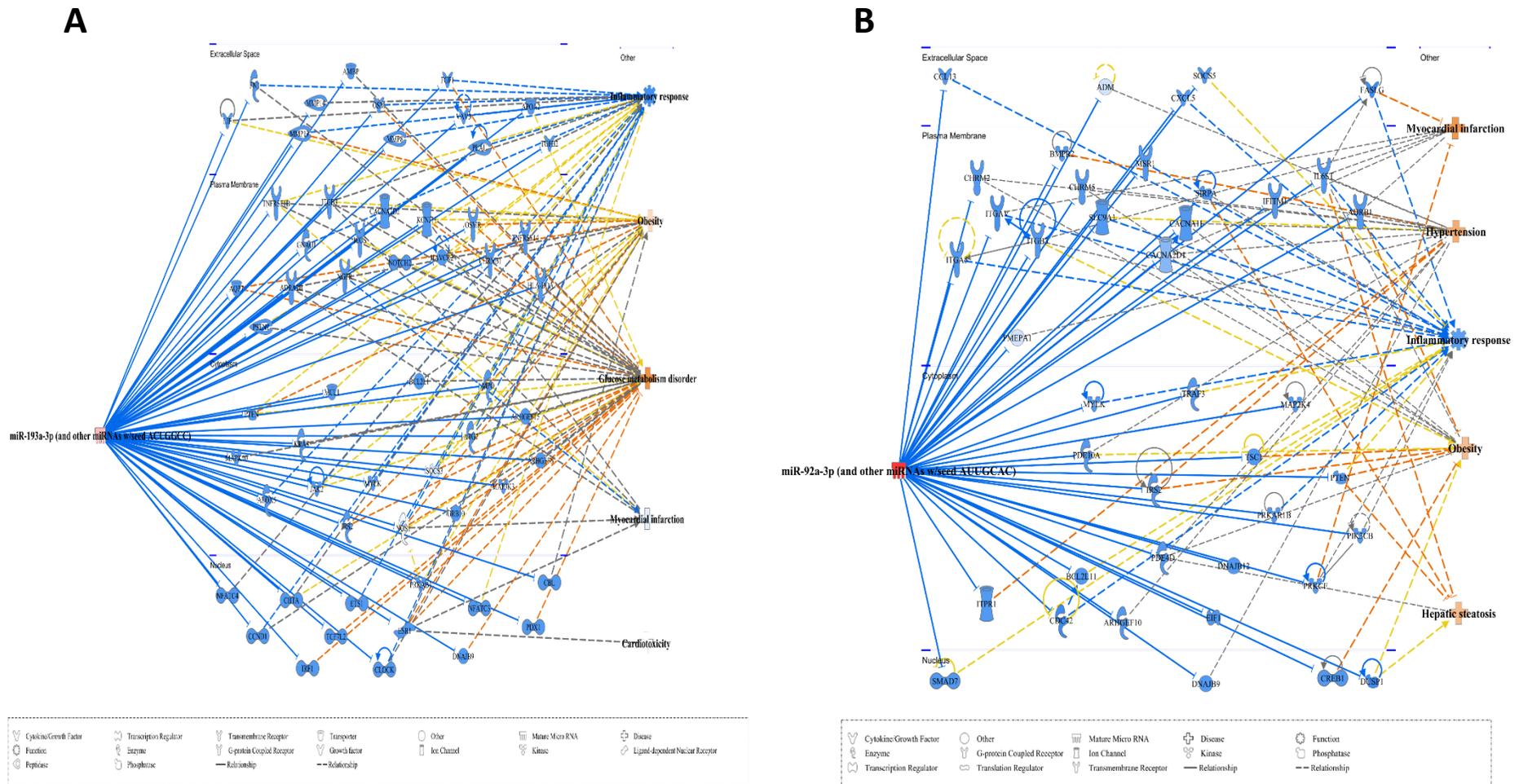


Figura 14. Identificação das prováveis vias de interação de miR-193a-3p (A) e miR-92a-3p (B) com os mRNA e supostos envolvimentos com doenças metabólicas. Estudo de predição das vias regulatórias foram realizadas utilizando a ferramenta *Ingenuity Pathways Analysis*.

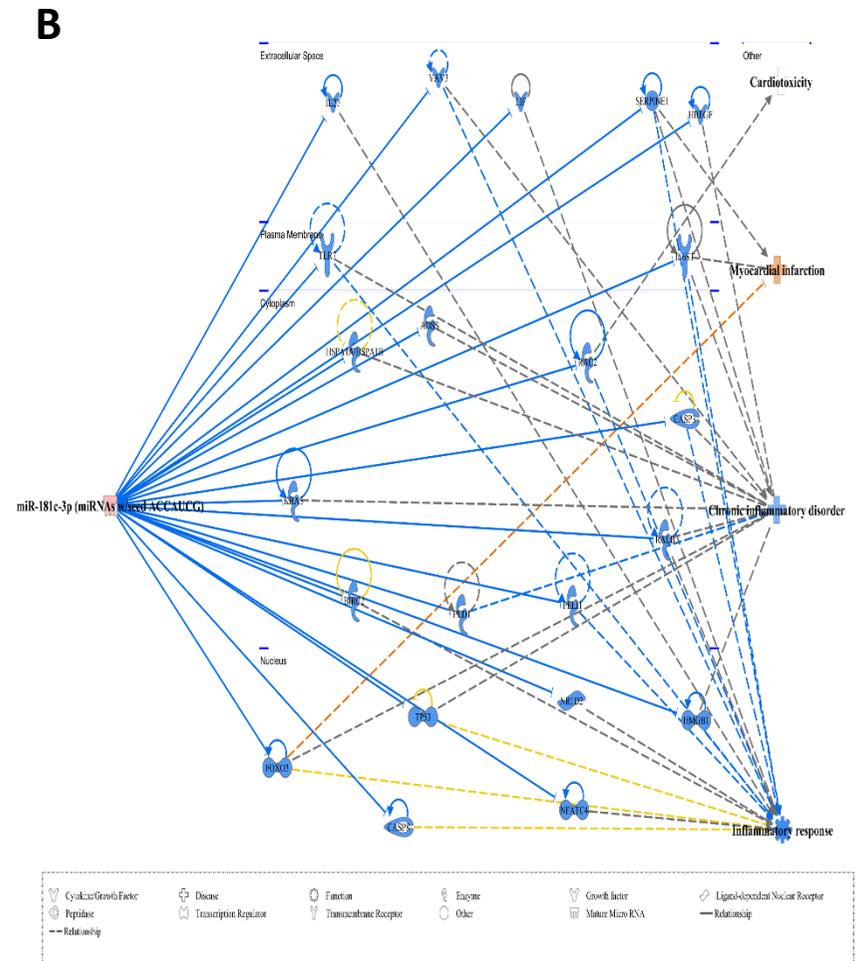
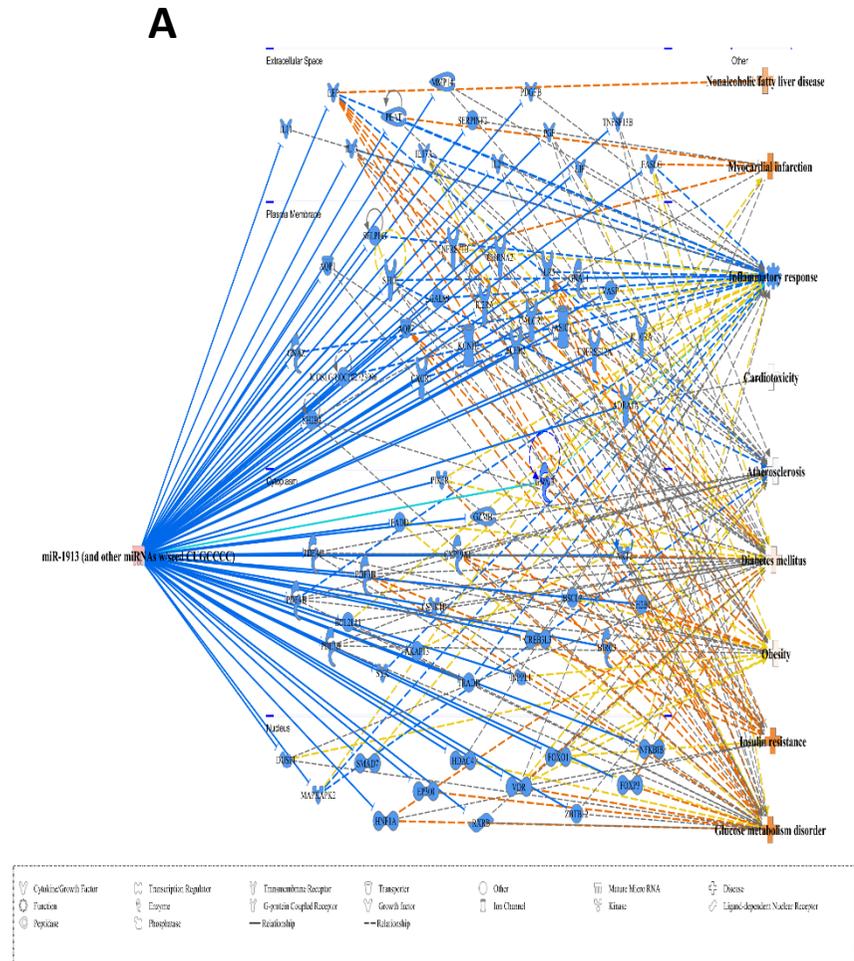


Figura 15. Identificação das prováveis vias de interação de miR-1913 (A) e miR-181c-3p (B) com os mRNA e supostos envolvimento com doenças metabólicas. Estudo de predição das vias regulatórias foram realizadas utilizando a ferramenta *Ingenuity Pathways Analysis*.

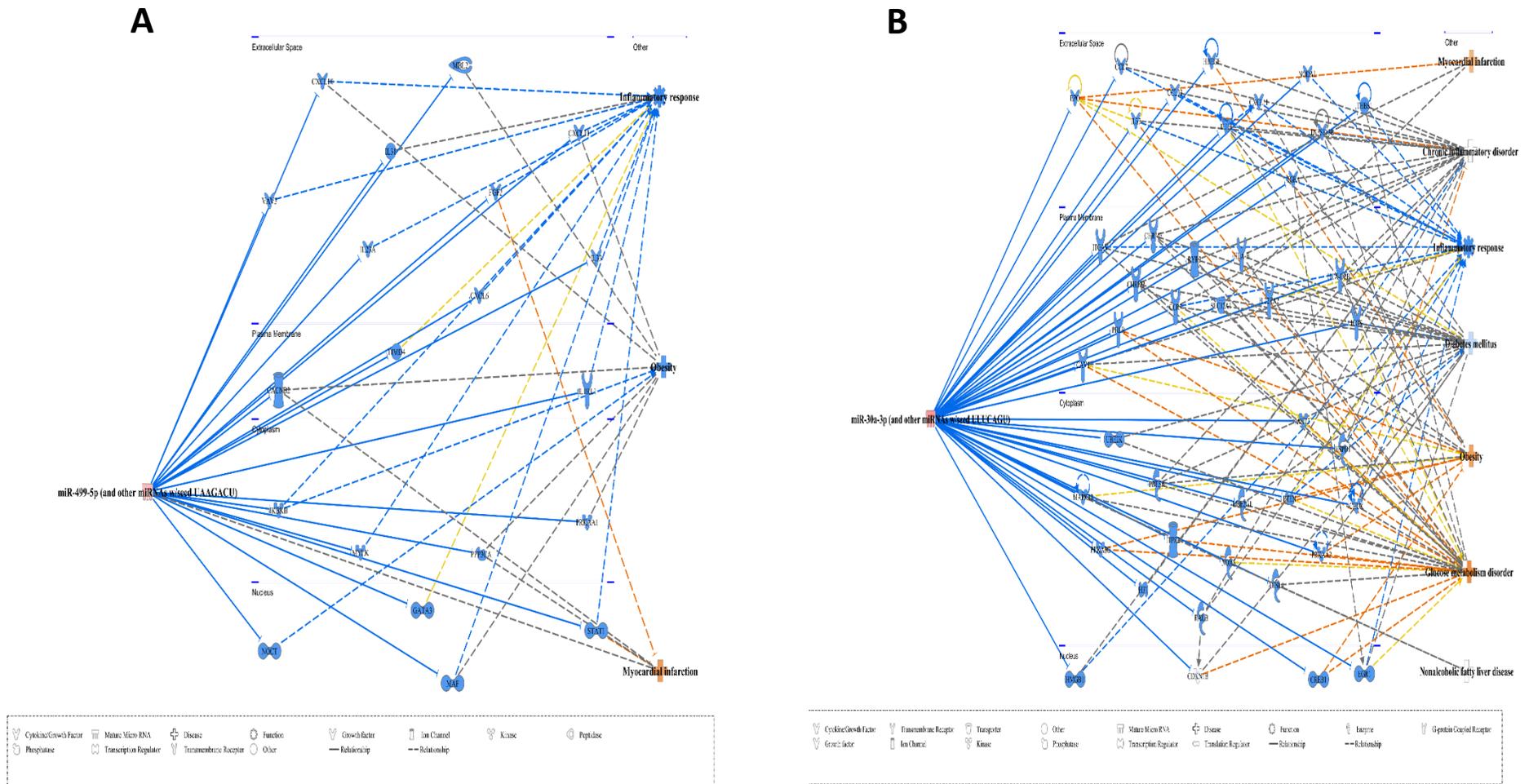


Figura 16. Identificação das prováveis vias de interação de miR-499-5p (A) e miR-30a-3p (B) com os mRNA e supostos envolvimento com doenças metabólicas. Estudo de predição das vias regulatórias foram realizadas utilizando a ferramenta *Ingenuity Pathways Analysis*.

4.3. Parâmetros clínicos e moleculares relacionados a síndrome metabólica

Os perfis clínico, demográfico e antropométrico dos pacientes com SM e sem SM foram mostrados na **Tabela 8**. Comparado com o grupo sem SM, o grupo com SM apresentou média de idade superior, bem como maiores valores de peso corporal, circunferência do quadril, RCQ, percentual de gordura corporal e valores de IMC ($p < 0,001$, para todas as condições). Como esperado, a prevalência de pacientes obesos, dislipidêmicos, hipertensos, com DM2 e resistência à insulina ($p < 0,001$, para todos) também foi maior no grupo síndrome metabólica. Também se observou maior prevalência de tabagista, etilista, e pouco praticantes de atividade física diária ($p < 0,001$ para todos) e história familiar de DCV ($p = 0,007$) também foram mais frequentes no grupo com síndrome metabólica.

Os perfis metabólico, inflamatório e de adipocitocina também foram avaliados em pacientes com e sem síndrome metabólica (**Tabela 9**). Grupo com síndrome metabólica apresentou maiores concentrações de glicose e insulina, com consequentes maiores valores de HbA1c e HOMA-IR, do que os sem síndrome ($p < 0,001$, para todos os parâmetros). Maiores concentrações de triacilglicerois e VLDL-C e menores concentrações de HDL-C e ApoAI também foram encontradas no grupo síndrome metabólica ($p < 0,001$, para todos os parâmetros). Os pacientes com síndrome metabólica apresentaram também um perfil inflamatório alterado com maiores concentrações de fibrinogênio ($p = 0,001$), PCR-us ($p = 0,001$), IL-6 ($p = 0,003$), PAI-1 ($p = 0,001$), TNF α ($p < 0,001$), leptina ($p = 0,026$) e resistina ($p = 0,021$) e menores concentrações da adiponectina ($p < 0,001$) em comparação ao grupo sem síndrome metabólica.

Tabela 8. Características clínica, demográfica e antropométrica dos indivíduos classificados com e sem síndrome metabólica.

Variáveis	Sem SM (n=144)	SM (n=89)	p-valor
Idade, anos	48 (38-54)	53 (47-61)	<0,001
Masculino, % (n)	39,6 (57)	50,6 (45)	0,057
Peso corporal, Kg	74,0 ± 14,9	86,3 ± 14,8	<0,001
CA, cm	90 (84-98)	104 (96-111)	<0,001
RCQ	0,89 ± 0,09	0,96 ± 0,09	<0,001
IMC, Kg/m²	27,60 ± 4,9	32,3 ± 4,4	<0,001
Branco, % (n)	47,2 (68)	53,4 (47)	<0,001
Teor de gordura, %	31,67 (7,10)	35,15 (6,47)	0,001
Tabagismo, % (n)	10,4 (15)	15,9 (14)	<0,001
Consumo alcoólico, % (n)	38,9 (56)	37,5 (33)	<0,001
Infarto agudo do miocárdio, % (n)	2,1 (3)	13,6 (12)	<0,001
Prática de atividade física, % (n)	33 (48)	26,1 (23)	<0,001
Obesidade	27,1 (39)	70,8 (63)	<0,001
Dislipidemia, % (n)	50 (72)	95,5 (85)	<0,001
Hispertensão, % (n)	17,4 (25)	73,9 (65)	<0,001
Diabete melito tipo 2, % (n)	1,4 (2)	37,1 (33)	<0,001
Insulin Resistance, % (n)	32,6 (47)	85,4 (76)	<0,001

Histórico familiar

Doenças cardiovasculares, % (n)	50,7 (73)	71,9 (64)	0,007
Diabete melito tipo 2, % (n)	59,7 (86)	41,6 (37)	0,122
Hipertensão, % (n)	30,6 (44)	23,6 (21)	0,079
Hipercolesterolemia, % (n)	48,6 (70)	53,9 (48)	0,844

Nota: As variáveis contínuas são apresentadas como média \pm desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil) e foram comparadas pelo teste t ou pelo *Mann-Whitney U-test*, respectivamente. As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste qui-quadrado. *p-valor*<0,05 foi considerado estatisticamente significativo. SM: Síndrome metabólica

Tabela 9. Dados das determinações metabólicas, inflamatórias e adipocitocinas de pacientes com e sem síndrome metabólica.

Variáveis	Sem SM (n=144)	SM (n=89)	p-valor
Glicose, mg/dL	85 (80-90)	100 (87-109)	<0,001
HbA1c, %	5,70 (5,40-5,90)	6,00 (5,60-6,90)	<0,001
Insulina, µUI/ml	6,36 (4,13-8,92)	6,00 (5,60-6,90)	<0,001
HOMA-IR	1,34 (0,93-1,90)	2,72 (1,80-4,41)	<0,001
Colesterol total, mg/dL	204,50 (180-228,50)	195 (165-227)	0,192
Triacilgliceróis, mg/dL	105,5 (78,0-132,0)	168 (125-207)	<0,001
HDL-C, mg/dL	54,0 (46-68)	43,0 (36,0-48,0)	<0,001
LDL-C, mg/dL	124,60 (97,40-145,40)	112,70 (88,90-145,60)	0,116
VLDL-C, mg/dL	21,10 (15,60-26,40)	33,60 (25,00-41,40)	<0,001
ApoAI, mg/dL	155 (136-175)	132,00 (120,00-153,50)	<0,001
ApoB, mg/dL	101 (81,95-115,50)	100,00 (84,80-122,00)	0,597
Fibrinogênio, mg/dL	287,90 (240,70-326,50)	310,00 (278,00-366,00)	0,001
PCR-us, mg/dL	0,70 (0,50-1,00)	0,90 (0,60-1,30)	0,001
IL-6, pg/mL	1,41 (0,78-2,77)	1,94 (1,28-3,99)	0,003
PAI-1, ng/mL	79,00 (60,93-101,06)	106,16 (62,61-141,76)	0,001
TNF-α, pg/mL	3,72 (2,45-5,09)	5,06 (3,28-6,54)	<0,001
Adiponectina, µg/mL	15,82 (9,45-25,01)	10,58 (7,25-16,64)	<0,001

Leptina, ng/mL	11,80 (3,67-23,06)	14,33 (7,55-26,54)	0,026
Resistina, ng/mL	30,71 (19,87-47,90)	38,70 (25,24-65,58)	0,021

Nota: Variáveis contínuas são mostradas mediana (intervalo interquartílico) e comparadas pelo Mann-Whitney U-test, p-valor<0,05 foi considerado estatisticamente significativo, Hb1Ac, hemoglobina glicosilada; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; ApoA1: Apolipoproteína A1; ApoB: Apolipoproteína B; PCR-us; Proteína C Reativa ultra-sensível, TNF- α ; fator de necrose tumoral alfa; IL-6: interleucina 6, PAI-1; Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1. SM: Síndrome metabólica.

Em relação ao estudo de expressão de miRNAs, os resultados obtidos através do *PCR array* indicaram que nove miRNAs foram diferentemente expressos entre pacientes com síndrome metabólica e indivíduos saudáveis ($p < 0,05$) (**Figura 17**). O miR-183-5p ($p=0,008$) e miR-301a-3p ($p=0,007$) apresentaram uma diminuição na expressão, enquanto os miR-542-5p ($p=0,003$), miR-424-3p ($p=0,040$), miR-326 ($p=0,037$), miR-421 ($p=0,023$) e miR-574-3p ($p=0,001$) tiveram um aumento na expressão.

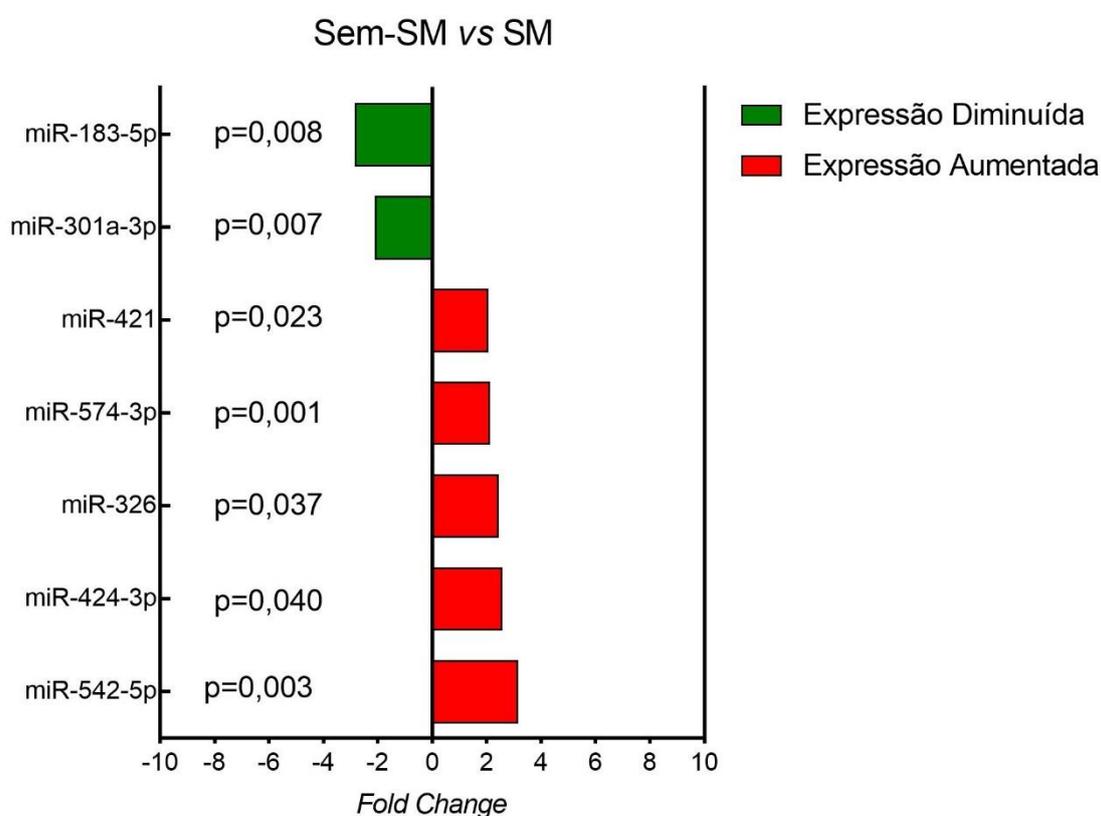


Figura 17. Expressão relativa dos miRNAs derivados do soro entre pacientes com e sem síndrome metabólica. Os dados são mostrados como *fold change* (FC) entre pacientes com obesidade vs. indivíduos com peso normal, normalizados pela média geométrica global de todos os 372 miRNAs testados na PCR array. Foram considerados somente valores de $FC > 2$ e o $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativos. SM: Síndrome metabólica.

Os miRNAs diferentemente expressos foram avaliados no soro de pacientes com e sem síndrome metabólica e o miR-421 manteve-se diferentemente expresso, apresentando valores maior de expressão no grupo com síndrome em comparação com os sem ($p=0,007$) (**Figura 18**).

Curiosamente, a expressão de miR-421 foi positivamente correlacionada com Hb1Ac ($r=0,151$, $p=0,023$), triacilgliceróis ($r=0,148$, $p=0,025$), VLDL-C ($r=0,148$, $p=0,025$), PCR-us ($r=0,145$, $p=0,030$), IL-6 ($r=0,186$, $p=0,006$) e resistina ($r=0,146$, $p=0,030$), assim como foi inversamente correlacionada com a adiponectina ($r=-0,138$, $p=0,041$).

Na regressão linear múltipla (*stepwise*) a expressão aumentada do miR-421 explicou em 11,4% o aumento da HbA1c (Modelo 1; $p<0,001$), em 14% a associação aumentada entre HbA1c e LDL-C (Modelo 2; $p<0,001$ e $p=0,008$, respectivamente), em 15,7% a associação aumentada da HbA1c, LDL-C e PAI-1 (Modelo 3; $p<0,001$, $p=0,005$ e $p=0,023$, respectivamente), em 18,3% a associação aumentada de HbA1c, LDL-C, PAI-1 e HOMA-IR (Modelo 4; $p=0,001$, $p=0,011$, $p=0,004$, $p=0,006$, respectivamente), em 20,1% o aumento de Hb1Ac, LDL-C, PAI-1, HOMA-IR, Glicose (Modelo 5; $p<0,001$, $p=0,008$, $p=0,001$, $p=0,008$, $p=0,021$, respectivamente), e em 22,5% verificou-se um aumento da associação de Hb1Ac, LDL-C, PAI-1, HOMA-ir, glicose e insulina (Modelo 6; $p<0,001$, $p=0,014$, $p=0,009$, $p<0,001$, $p=0,001$ e $p=0,007$, respectivamente) (**Tabela 10**).

O miR-421 foi então utilizado para o estudo de análise integrativa *in silico* usando o IPA (**Figura 19**). Os resultados, interessante mostraram que o miRNA, por predição, está associado com a regulação da expressão de 11 mRNA alvos, que por sua vez são componentes das vias regulatórias de doenças como infarto do miocárdio, obesidade, diabetes melito, esteatose hepática, tolerância a glicose, distúrbio do metabolismo da glicose, hiperglicemia e resistência à insulina, bem como atua em vias regulatórias da resposta inflamatória, sendo associado com a variabilidade na quantidade de citocinas, massa do tecido adiposo e quantidade de leptina no sangue.

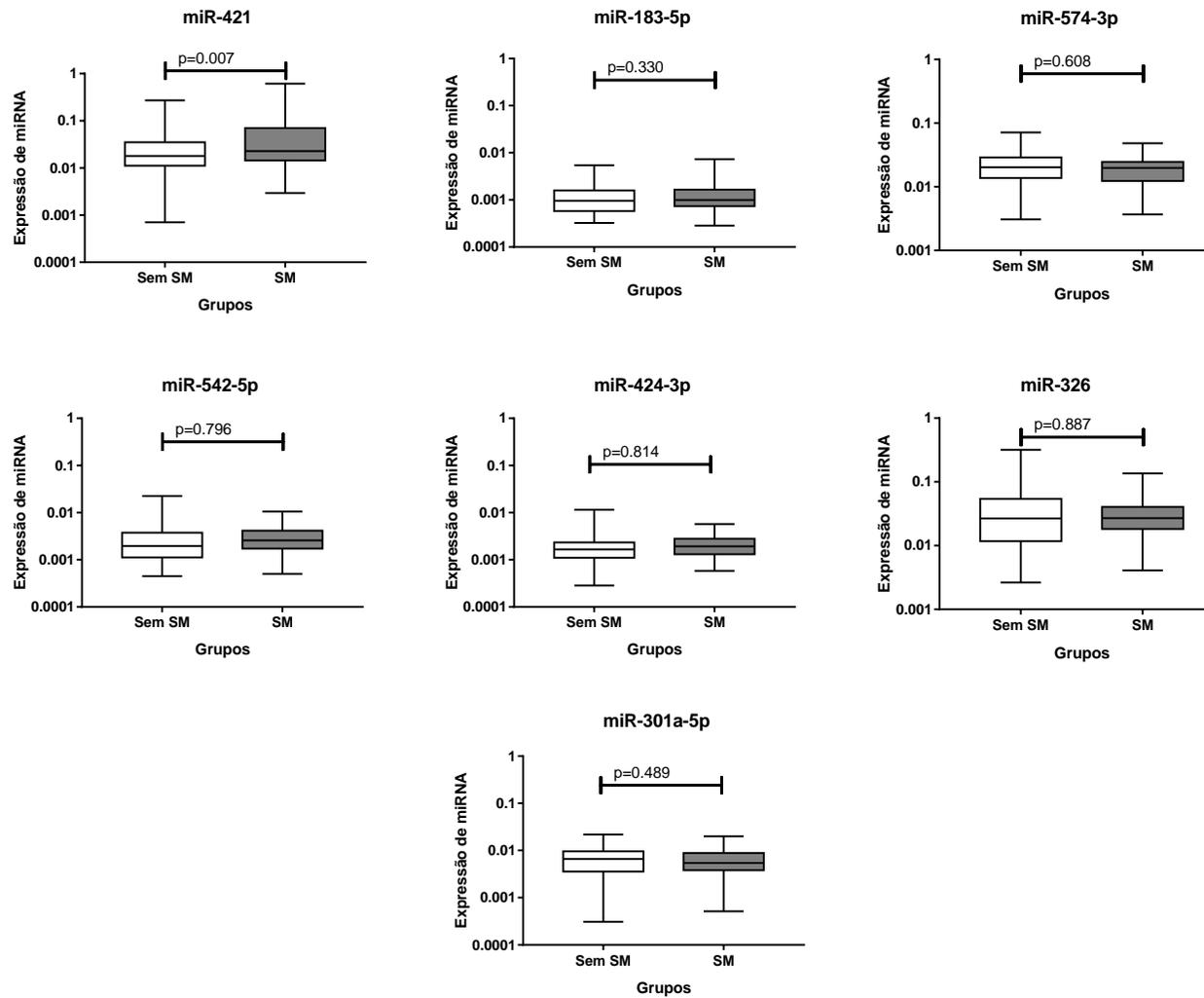


Figura 18. Expressão de miRNA do soro de pacientes com e sem Síndrome metabólica. Os dados são apresentados como mediana e intervalo interquartil, e os valores obtidos pela fórmula de $2^{-\Delta Ct}$ e foram comparados pelo *Mann-Whitney U-test*, *p-valor* < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. SM: Síndrome metabólica.

Tabela 10. Regressão linear múltipla *Stepwise*: Contribuição do miR-421 na variabilidade dos parâmetros metabólicos e inflamatórios.

Modelo	Variáveis Independentes	B (S,E,)	p-valor	R ²	R ² Corrigido
1	Constante	-0,055 (0,019)	0,003	0,118	0,114
	HbA1c	0,016 (0,003)	<0,001		
2	Constante	-0,021 (0,022)	0,359	0,148	0,140
	HbA1c	0,015 (0,003)	<0,001		
	LDL-C	<0,001 (<0,001)	0,008		
3	Constante	-0,011 (0,023)	0,627	0,169	0,157
	HbA1c	0,017 (0,003)	<0,001		
	LDL-C	<0,001 (<0,001)	0,005		
	PAI-1	<0,001 (<0,001)	0,023		
4	Constante	-0,007 (0,023)	0,754	0,199	0,183
	HbA1c	0,011 (0,003)	0,001		
	LDL-C	<0,001 (<0,001)	0,011		
	PAI-1	<0,001 (<0,001)	0,004		
	HOMA-IR	0,006 (0,002)	0,006		
5	Constante	-0,005 (0,023)	0,845	0,220	0,201
	HbA1c	0,021 (0,005)	<0,001		
	LDL-C	<0,001 (<0,001)	0,008		
	PAI-1	<0,001 (<0,001)	0,001		
	HOMA-IR	0,006 (0,002)	0,008		
	Glicose	<0,001 (<0,001)	0,021		
6	Constante	0,009 (0,024)	0,717	0,247	0,225
	HbA1c	0,024 (0,005)	<0,001		
	LDL-C	<0,001 (<0,001)	0,014		
	PAI-1	<0,001 (<0,001)	0,009		
	HOMA-IR	0,019 (0,005)	<0,001		
	Glicose	-0,001 (<0,001)	0,001		
	Insulina	-0,004 (0,001)	0,007		

LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; Hb1Ac, hemoglobina glicosilada; IL-6, interleucina 6. Todos os modelos utilizaram a expressão miR-421 como variável dependente. *p-valor*<0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

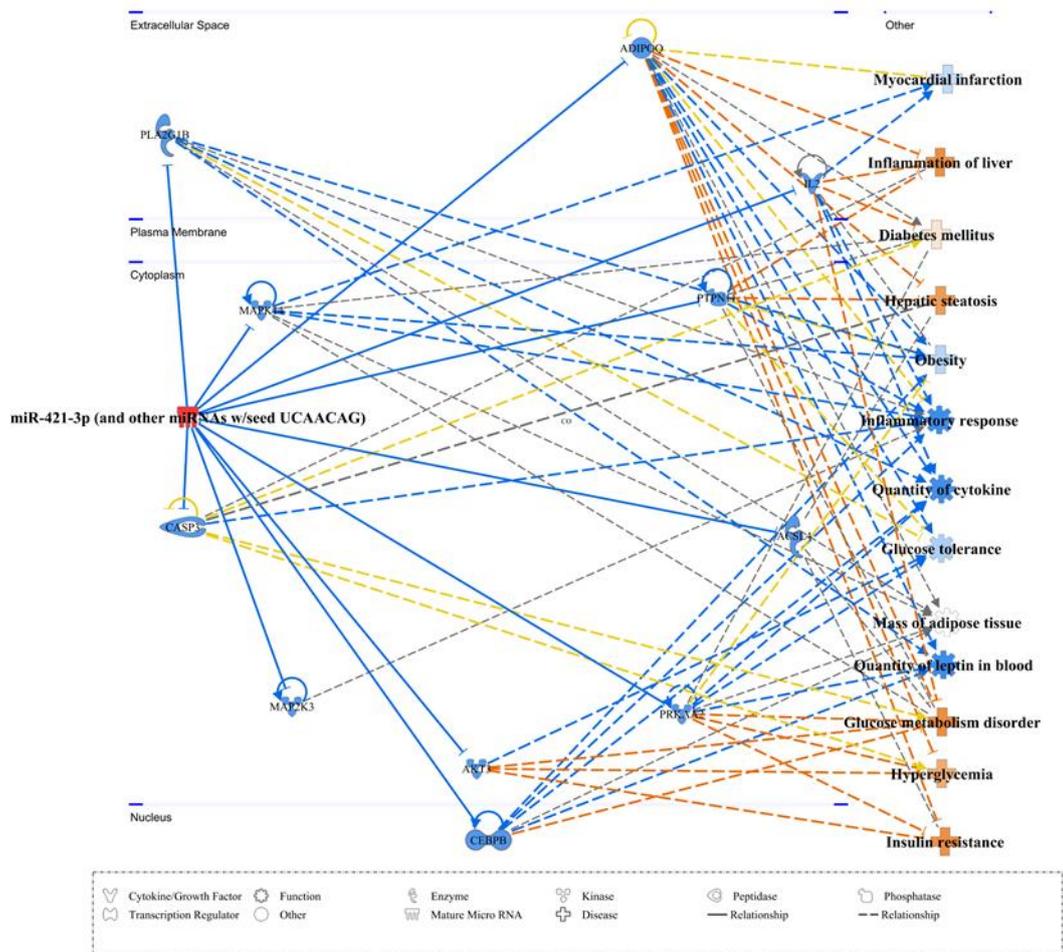


Figura 19. Identificação das prováveis vias de interação de miR-421-3p com os mRNA e supostos envolvimento com doenças metabólicas. Estudo de predição das vias regulatórias foram realizadas utilizando a ferramenta *Ingenuity Pathways Analysis*.

A sensibilidade e especificidade dos miR-574-3p, miR-542-5p, miR-424-3p, miR-326, miR-421 e miR-301a-3p em relação à síndrome metabólica, na qual foi determinada a área sob a curva (*Area Under the Curve*: AUC). Quanto maior a AUC melhor é o sistema (**Figura 20**). O miRNA que apresentou maior AUC (0,5916) foi miR-421 (0,59; IC 95%: 0,52-0,67) e a significância estatística ($p=0,017$), portanto é o melhor marcador para síndrome metabólica.

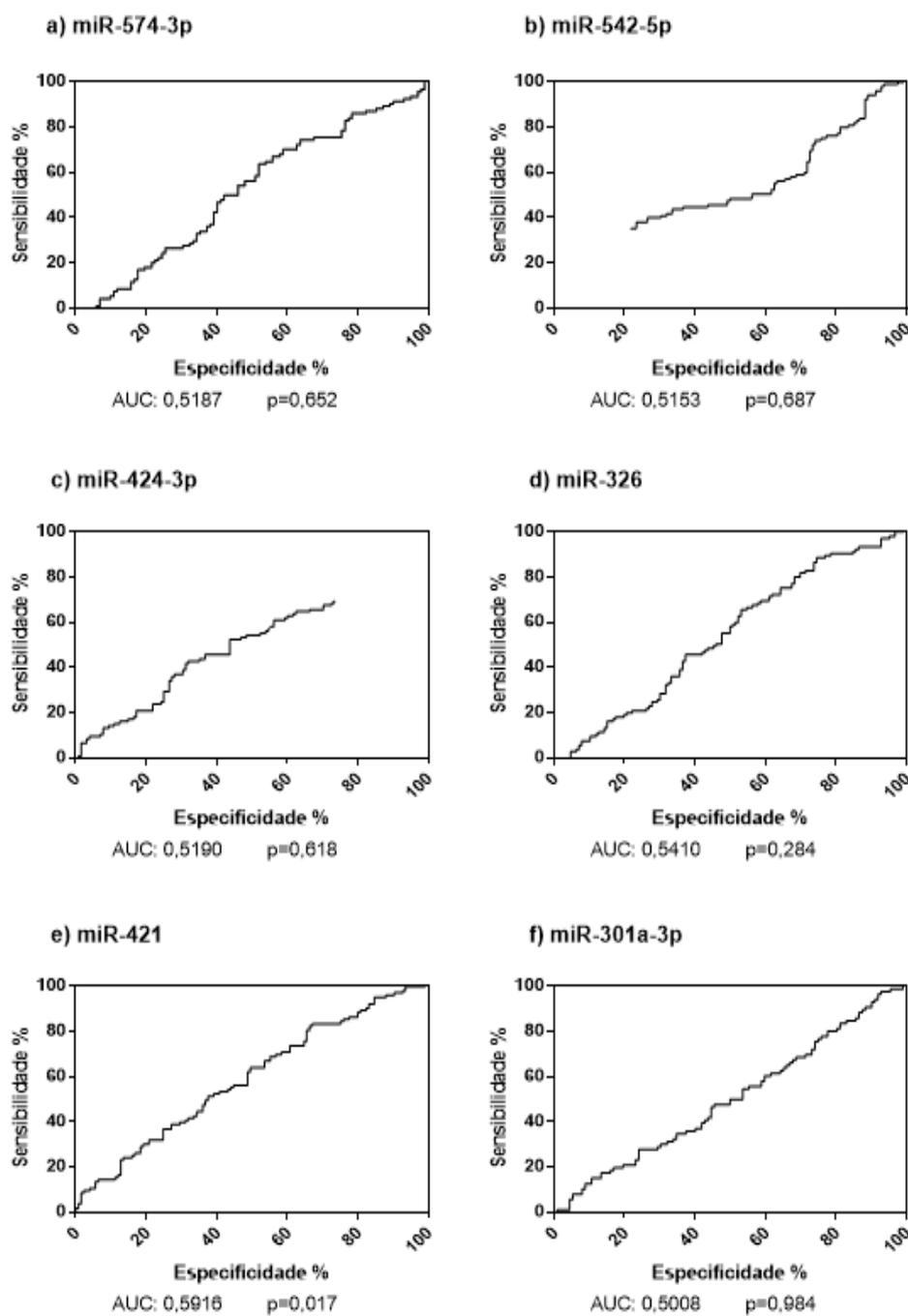


Figura 20. Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) construída para avaliar o potencial marcador biológico da síndrome metabólica dos miRNAs séricos. A área sob a curva (*Area Under the Curve*: AUC) determina o melhor sistema.

Considerando a associação da expressão do miR-421 com o perfil glicídico, analisamos ainda a relação entre sua expressão com a resistência à insulina. Os resultados indicaram uma expressão aumentada do miRNA em pacientes com resistência à insulina em comparação com pacientes sem resistência à insulina ($p=0,014$, **Figura 21**), indicando uma um papel regulatório do miRNA na homeostase da glicose.

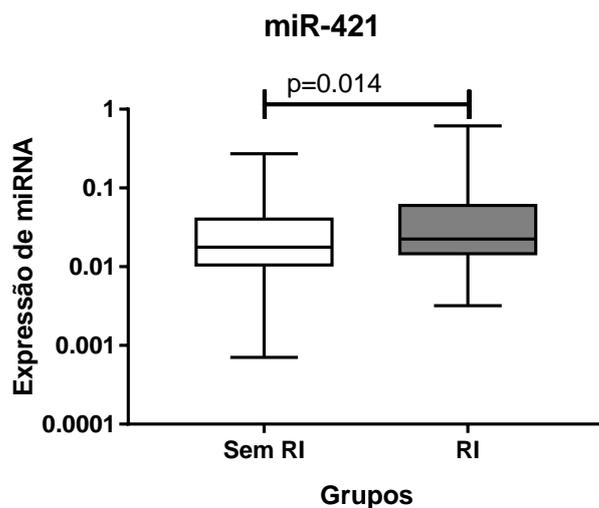


Figura 21. Expressão de miRNA do soro de pacientes com e sem resistência à insulina. Os dados são apresentados como mediana e intervalo interquartile, e os valores obtidos pela fórmula de $2^{-\Delta Ct}$ e foram comparados pelo *Mann-Whitney U-test*, $p\text{-valor}<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. DISCUSSÃO

A obesidade é o desequilíbrio entre a ingestão e o gasto energético por um longo período, principalmente com aumento do consumo de alimentos com alto conteúdo calórico, associado ao estilo de vida sedentário. Além disso, a obesidade é uma doença multifatorial relacionada ao aumento da predisposição dos pacientes a desenvolverem à resistência à insulina, diabetes melito tipo 2 (DM2), e conseqüentemente síndrome metabólica e DCV (Nguyen *et al.*, 2008; Constantin *et al.*, 2010; Cristóvão *et al.*, 2011; Farooqi, 2011). Dados epidemiológicos e experimentais também demonstram uma estreita relação entre a obesidade, as complicações metabólicas e a inflamação crônica (Mello *et al.*, 2006; Hossain *et al.*, 2007; Shuldiner, 2008).

No entanto, existe uma significativa variabilidade fenotípica entre os indivíduos acometidos com a doença, a qual têm sido estabelecida pela presença de fatores genéticos ligados ao metabolismo energético (Stunkard *et al.*, 1986; Stunkard *et al.*, 1990). Porém, a contribuição da genética não explica totalmente a herdabilidade da obesidade e suas complicações, emergindo a necessidade de buscar novas vias regulatórias associadas à sua fisiopatologia, como por exemplo as modificações epigenéticas.

No presente estudo, o perfil epigenético de pacientes obesos, com resistência à insulina e/ou com síndrome metabólica foi avaliada usando PCR *array* de 382 miRNAs. Além disso, o perfil de expressão dos miRNAs foi relacionado com o perfil antropométricos, clínico e bioquímico, incluindo marcadores glicídicos, lipídicos e inflamatórios dos indivíduos estudados, visando a melhor compreensão dos mecanismos epigenéticos relacionados ao desenvolvimento dessas doenças metabólicas e suas complicações. Além disso, o estudo objetiva buscar novos biomarcadores moleculares de diagnósticos para as doenças estudadas.

Como esperado, os indivíduos obesos recrutados para o presente estudo apresentaram, sob o ponto de vista antropométrico, valores elevados de IMC, CA, RCQ e maior adiposidade (taxa de gordura), taxa metabólica basal e redução da massa magra. Similarmente aos nossos dados antropométricos, Flegal e colaboradores (2009) observaram uma correlação do percentual de gordura com CA em homens e em mulheres, uma correlação mais forte com o IMC. Em estudo prévio de coorte na população australiana, com 4175 homens,

também foi verificada medidas acentuadas de obesidade central como a CA e RCQ (Dhaliwal et al. 2014). Além disso, as alterações no IMC e CA foram associadas com fatores de risco de DCV em pacientes coreanos (Sung et al. 2007).

No presente estudo, observou-se frequência aumentada de indivíduos obesos que pararam de fumar. Este representa um dado importante de fator não genético relacionado a obesidade uma vez que a adesão de abandono foi de 27,5% nos obesos e de acordo com estudo prévio Williamson e colaboradores (1991), o abandono do tabagismo está associado com aumento de peso corporal, em média, de 2,8kg em homens e 3,8kg em mulheres. A relação entre o tabagismo e peso corporal não é totalmente compreendida, porém relatos indicam que esteja relacionado com o aumento da atividade adrenérgica, aumentando diretamente a termogênese e, dessa maneira, reduzindo o peso (Lee et al., 2006; Chatkin e Chatkin, 2007).

No presente estudo foi observada uma maior frequência de hipertensos, diabéticos e dislipidêmicos, além de uma maior frequência de histórico familiar de DCV em indivíduos obesos, corroborando com a literatura prévia que relaciona o aumento da massa gorda corporal como o aumento da prevalência destas doenças e também com a síndrome metabólica (Nguyen et al. 2008; Lau 2005)

Particularmente o aumento excessivo de peso corporal, é um fator de risco estabelecido para diabetes melito tipo 2 (Pinkney, 2002; Daousi et al., 2006; Gregg et al., 2007). A relação entre obesidade e diabetes melito tipo 2 tem sido explicada através da influência dos adipócitos de indivíduos obesos sob o perfil de secreção e função endócrina, conduzindo ao aumento da secreção de adipocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (Sell et al., 2006). O aumento da secreção destas adipocinas está associado a disfunção nas células- β , levando a falha na liberação da insulina e aumento da glicemia (Kahn et al., 2006), com consequente aumento do risco de desenvolver DM2 (Eckel et al., 2011). Além disso, o processo inflamatório, de acordo com estudo prévio norte americano com indivíduos do MESA (*Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*), foi constatado que o estado de obesidade e inflamação também está fortemente associado ao risco de hipertensão (Lakoski et al., 2011).

Neste estudo, demonstrou-se que os pacientes obesos apresentaram valores aumentados de insulina, glicose, hemoglobina glicada, HOMA- β e HOMA-IR, bem como concentrações aumentadas de LDL-C, VLDL-C e triacilgliceróis e diminuídos de HDL-C e Apo AI. Além disso, apresentaram valores aumentados da PCR-us ($p=0,002$), do fibrinogênio ($p<0,001$), do TNF- α ($p<0,001$), do PAI-1 ($p<0,001$) e da IL-6 ($p<0,001$), da resistina ($p=0,002$), e da leptina ($p<0,001$), que em associação com a adiponectina ($p<0,001$) reduzida, subsidia a hipótese da influência do aumento do teor de gordura e dos adipócitos na secreção de citocinas inflamatórias e adipocinas e sua influência no desenvolvimento do diabetes melito.

A redução da Apo A1 plasmática é forte e positivamente relacionada ao risco aumentado de desenvolver doenças cardiovasculares, uma vez que a Apo AI é a principal apolipoproteína da HDL que exerce função no transporte reverso do colesterol (Andrikoula e Mcdowell, 2008). O HDL-C e a ApoA1 totais são preditores mais poderosos de doença arterial coronariana (Garfagnini *et al.*, 1995; O'brien *et al.*, 1995). Da mesma forma, o estudo epidemiológico prospectivo de infarto do miocárdio relatou que os valores do HDL-C e Apo AI foram significativamente menores nos pacientes que tiveram eventos coronarianos (Luc *et al.*, 2002).

A PCR-us é produzida principalmente pelo fígado, sob a estimulação de citocinas pró-inflamatórias que são provenientes dos adipócitos (Pepys e Hirschfield, 2003). Fronczyk e colaboradores (2013) demonstraram que as concentrações da PCR estão aumentadas em obesos com DM2, e que esse resultado é devido ao excesso de gordura corporal. Os dados do nosso estudo corroboram com os resultados destes estudos.

A hiperleptinemia por sua vez, é atribuída às alterações no receptor de leptina ou à deficiência em seu sistema de transporte, na barreira hematoencefálica, fenômeno este denominado resistência à leptina (Ihara *et al.*, 2006; Romero e Zanesco, 2006). A resistência à leptina é também um fator que tem sido associado ao risco aumentado para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, síndrome metabólica e hipertensão (Ihara *et al.*, 2006; Romero e Zanesco, 2006; Suriyaprom *et al.*, 2014). A retroalimentação negativa é interrompida na maioria dos obesos, resultando na resistência à leptina que ocorre em resposta à sinalização em excesso – que é um

mecanismo clássico de resistência ao hormônio (Knight *et al.*, 2010). Stepien e colaboradores (2012) demonstraram também que a resistência à insulina e à leptina apresenta um papel determinante na fisiopatologia da hipertensão e obesidade grave, o que corroboram com nossos resultados.

A adiponectina é um marcador secretado exclusivamente pelo tecido adiposo (Scherer *et al.*, 1995), tendo papel na regulação da homeostase da energia e funciona em combinação com a leptina (Yamauchi *et al.*, 2001). Esta adipocina foi relatada, em estudos prévios, estar diminuída em pacientes com obesidade, DM2 e principalmente naqueles com resistência à insulina (Weyer *et al.*, 2001).

Além das adipocinas (adiponectina, leptina e resistina), o tecido adiposo é responsável pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6) (Hotamisligil, 2006; Tilg e Moschen, 2006). Os resultados obtidos no presente estudo mostram características de um processo inflamatório nos pacientes obesos. Estudos realizados com pacientes com perfil semelhante demonstraram o perfil inflamatório no tecido adiposo (TNF- α e IL-6 diminuí e aumenta adiponectina) é reduzido com a perda de peso excessiva (Dandona *et al.*, 1998; Fontana *et al.*, 2007; Moschen *et al.*, 2010).

Em relação ao biomarcador PAI-1, alguns estudos mostraram que concentrações elevadas desse estão associadas com obesidade e síndrome metabólica (Alessi *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2013; Kenny *et al.*, 2013) e estudo com 145 mulheres, com idade superior a 40 anos, realizado no sul do Brasil, demonstrou uma correlação positiva entre os valores de PAI-1, RCQ e os de triacilgliceróis (De Souza *et al.*, 2012).

Recente revisão demonstrou que a sinalização de NF- $\kappa\beta$ e o desenvolvimento da obesidade e doenças metabólicas estão relacionadas através de diversos mecanismos, especialmente por afetar a sensibilidade à insulina no tecido hepático, com impactos na ação central da insulina e a sensibilidade à leptina (Catrysse e Van Loo, 2017). Além disso, estudos tem indicado que no processo inflamatório que ocorre no tecido adiposo hipertrófico, as citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , MCP-1, entre outras) secretadas, juntamente com as citocinas secretadas pelos macrófagos prejudicam a via de sinalização da insulina, resultando no risco maior de

desenvolver a resistência insulínica e disfunção tecidual pancreática (Kim e Sears, 2010; Francisqueti *et al.*, 2015).

Nesse contexto, o presente estudo também avaliou o perfil bioquímico (glicídico, lipídico) e inflamatório em pacientes que apresentaram resistência à insulina. Interessantemente, o perfil bioquímico destes pacientes foram estreitamente semelhantes aos pacientes obesos, incluindo o perfil o perfil glicídico alterado com valores de aumentados de glicemia, hemoglobina glicada, insulina, refletindo no aumento dos valores de HOMA- β e HOMA-IR no grupo; assim como em pacientes com resistência à insulina em comparação com aqueles sem diagnóstico de resistência à insulina ($p < 0,001$ para todos os parâmetros) e aumentos da concentração de VLDL-C ($p < 0,001$) e triacilgliceróis ($p < 0,001$) e valores reduzidos de HDL-C ($p < 0,001$) e APOA1 ($p < 0,001$) nos pacientes com resistência à insulina também em comparação com aqueles sem esta desordem metabólica.

Em relação ao perfil inflamatório dos pacientes com resistência à insulina também observou-se que os valores da PCR-us ($p = 0,045$), fibrinogênio ($p < 0,001$), TNF- α ($p < 0,001$), PAI-1 ($p < 0,001$) e IL-6 ($p < 0,001$) foram aumentados nos pacientes portadores da desordem em comparação ao grupo de pacientes não portadores. Além disso, os valores das adipocinas, resistina ($p = 0,004$) e leptina ($p < 0,001$), estavam aumentados. Embora não estatisticamente significativa, a adiponectina foi reduzida e em associação aos outros resultados apresentados refletem a similaridade entre o perfil metabólico na obesidade e resistência à insulina, caracterizados pelo aumento da secreção de citocinas inflamatórias e adipocinas.

A resistência à insulina pode ser agrupada principalmente em dois fatores etiológicos: Alterações da sinalização da insulina nos tecidos periféricos devido à redução dos receptores de insulina e/ou na afinidade dos receptores devido à mutação estrutural ou sinalização de alterações (Taubes, 2009). O outro fator etiológico é a obesidade, que está associada à produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e adipocinas (Saini, 2010).

No entanto, apesar dos resultados apresentados, os mecanismos celulares e moleculares que relacionam os diversos distúrbios metabólicos são

complexos e permanecem pouco definidos. Na última década, o papel dos miRNAs tem sido explorados e sugere-se que eles desempenham funções importantes no perfil de uma infinidade de processos, o que aponta também para um possível uso diagnóstico (Karolina *et al.*, 2012; Monroig e Calin, 2013; Jones *et al.*, 2017).

O processo epigenômico pode contribuir com informações refinadas e pouco estabelecidas de mecanismos aplicável na prática clínica, permitindo o diagnóstico de processo em desenvolvimento de comorbidades permitindo intervenção em tempo hábil e o processo fisiopatológico seja interrompido, contribuindo para direcionar a terapêutica de forma mais preventiva com melhores respostas (Yang *et al.*, 2011). Alguns estudos vêm utilizando a PCR *array* e demonstrando que os miRNAs são desregulados na obesidade e resistência à insulina, sugerindo mecanismos moleculares para melhor compreensão da atividade dos miRNAs e sua influência na adiposidade e sensibilidade à insulina (Ortega *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015).

Recentemente, os biomarcadores tendem a desempenhar um papel fundamental no diagnóstico precoce, no prognóstico, e no controle terapêutico de doenças (He *et al.*, 2014). Algumas pesquisas indicam que os miRNAs tem grande potencial como novos biomarcadores moleculares de determinadas doenças, como o câncer e a aterosclerose, além da susceptibilidade às doenças infecciosas (Pluvinet *et al.*, 2004), com necessidade de mais estudos para consagrar tais proposições.

No presente estudo, pode ser estabelecer 13 miRNAs diferentemente expressos nos pacientes obesos, sendo três com expressão aumentada aproximadamente 2 vezes [miR-1224-5p ($p=0,034$), miR-181a-5p ($p=0,020$) e miR-139-3p ($p=0,027$)], quatro com uma expressão aumentada de aproximadamente 3 vezes [miR-1224-3p ($p=0,044$), miR-195-3p ($p=0,047$), miR-27a-5p ($p=0,041$) e miR-346 ($p=0,010$)], três com uma expressão aumentada de aproximadamente 4 vezes [miR-1207-5p ($p=0,027$), miR-483-5p ($p=0,034$), miR-296-3p ($p=0,010$)], dois com um aumento da expressão de aproximadamente 5 vezes [let-7g-2-3p ($p=0,001$) e miR-1-3p ($p=0,002$)] e um com uma expressão aumentada de aproximadamente 6 vezes [miR-95-3p ($p=0,003$)] nos indivíduos obesos em comparação aos não obesos.

Nos indivíduos classificados com resistência à insulina observou-se o aumento da expressão de 11 miRNAs, sendo em aproximadamente 2 vezes o miR-193a-3p ($p=0,005$), miR-346 ($p=0,019$), miR-95-3p ($p=0,019$), miR-499a-5p ($p=0,049$), miR-1224-3p ($p=0,012$) e o miR-1913 ($p=0,014$), uma expressão aumentada em aproximadamente 3 vezes o miR-181c-3p ($p=0,005$), miR-483-5p ($p=0,020$) e miR-30a-3p ($p=0,008$), um aumento de expressão em aproximadamente 4 vezes o miR-296-3p ($p=0,008$) e de cerca de 6 vezes o miR-92a-3p ($p=0,040$) nos indivíduos com resistência à insulina em comparação aos sem resistência.

Interessantemente, cinco miRNAs (miR-346, miR-483-5p, miR-296-3p, miR-1224-3p e miR-95-3p) tiveram perfil de expressão semelhante nos dois grupos de pacientes, obesos e com resistência à insulina, indicando um potencial papel desses miRNAs na regulação das vias regulatórias que interligam a duas doenças metabólicas.

O miR-346 foi relacionado com a regulação de 25 genes alvos, *ARG2*, *BCL2*, *CCL2*, *CDC42*, *CXCR4*, *EDN1*, *EGFR*, *ESR1*, *F2*, *FN1*, *GNA12*, *HSPD1*, *IGF1*, *ITGA2B*, *KRAS*, *LYZ*, *MEF2A*, *MYLK*, *PDE7A*, *PKLR*, *PPP2R2B*, *PRKCE*, *SLC8A1*, *THBS1* e *TTR*, presentes em vias metabólicas de interesse como obesidade, resposta inflamatória, doença hepática gordurosa não alcoólica, esteatose hepática, diabetes melito, distúrbio do metabolismo da glicose e doenças cardiovasculares. Estudo previo identificou que o miR-346, em sinergismo com o miR-199, regulam a citocina LIF (fator inibidor de leucemia) durante a diferenciacao das células estromais multipotentes humanas, resultando em maior diferenciação de adipócitos e osteoblastos (Oskowitz *et al.*, 2008).

O miR-483-5p foi relacionado com a predição dos genes alvos *ADRA2C*, *AQP7*, *CASP8*, *CYP7A1*, *F2R*, *GRB2*, *GRK2*, *HNF4A*, *IFIT3*, *IL12B*, *LEP*, *MAP2K3*, *MAPK1*, *MAPK3*, *MAPKAPK2*, *PDGFRA*, *RHOA* e *SERPINE1*, associados a vias envolvidas em doença hepática gordurosa não alcoólica, infarto agudo do miocárdio, hipertensão, distúrbio do metabolismo da glicose, diabetes melito e resposta inflamatória. Similarmente, estudo avaliando a expressão de miRNAs circulantes na obesidade demonstrou que o miR-483-5p estava significativamente aumentado em pacientes obesos em relação aos não

obesos (Ortega *et al.*, 2013). Além disso, o miR-483-5p pode estar envolvido com a via de sinalização da insulina através do controle da expressão de *IGF-2* (fatores de crescimento de insulina) desempenhando um significativo papel na resistência a insulina e diabetes tipo 2 (Chakraborty *et al.*, 2014) e também regula negativamente a expressão de *Socs3*, fator de resistência à leptina na obesidade, em linhagens celulares (HepG2 e Hela) e células de camundongo (Ma, N. *et al.*, 2011).

O miR-1224-3p com aumento de expressão aqui descrito pode atuar na regulação dos genes alvos *ADIPOR2*, *AGPAT1*, *AQP7*, *CASP8*, *CD86*, *CHRM1*, *CHRM2*, *CHRNA2*, *CHRNB1*, *DHCR24*, *IL36RN*, *IL6R*, *IL6ST*, *KCNJ11*, *LEP*, *MAPK13*, *MMP9*, *MYD88*, *OSM*, *SMAD1*, *SP1*, *TNFRSF11A* e *VDR*, atuantes em vias de sinalização mediadas por citocinas e quimiocinas, obesidade, esteatose hepática, infarto do miocárdio, resistência a insulina, hipertensão, distúrbio do metabolismo da glicose e massa de tecido adiposo. Em um estudo *in vitro* utilizando células HepG2, o miR-1224-3p também mostrou ser envolvido em algumas doenças e desordens metabólicas, uma vez que sua expressão foi aumentada nas células tratadas com proantocianidinas, polifenóis mais abundantes na dieta humana, que tem efeito sobre uma variedade de desordens metabólicas como inflamação, obesidade, diabetes e resistência à insulina (Arola-Arnal e Bladé, 2011).

O miR-296-3p regula 14 mRNAs dos genes *AQP5*, *CASP8*, *CCR3*, *CD14*, *CD40LG*, *CXCL8*, *HLA-DOA*, *HLA-DRB5*, *ICAM1*, *IL6ST*, *NGFR*, *PPP3R2*, *SMURF2* e *VEGFB* indicado pelo estudo *in silico*, os quais estão relacionados com obesidade, infarto agudo de miocárdio, resposta inflamatória, diabetes melito e esteatose hepática. O miR-296 pode desempenhar papéis cruciais na regulação da angiogênese, resposta inflamatória, metabolismo do colesterol, hipertensão, proliferação celular e apoptose (Li *et al.*, 2018). Interessantemente, uma alta expressão de miR-296-3p foi encontrada no hipotálamo de camundongos obesos com deficiência de leptina quando comparado ao controle (Crépin *et al.*, 2014). Estudo de predição *in silico*, mostrou que o miR-296-3p possui sítios de ligação na região 3'UTR do *INSR*, gene que codifica o receptor de insulina (Yang *et al.*, 2016).

O miR-95-3p regula 3 mRNAs de genes alvos (*CD247*, *PDE4A* e *TRAF3*) relacionados também com resposta inflamatória. Em estudo prévio com pacientes recentemente diagnosticados com diabéticos do tipo 2, o miR-95 foi significativamente associado ao tamanho dos adipócitos e teve sua expressão significativamente maior durante a diferenciação dos adipócitos nos pacientes diabéticos. Além disso, em amostras de tecido subcutâneo abdominal a expressão do miR-95 foi positivamente relacionada as concentrações séricas de adiponectina e negativamente correlacionadas com PCR-us e IL-6 (Klötting *et al.*, 2009).

Mediante tais resultados obtidos seguiu-se estudos para avaliar o perfil epigenético de pacientes com síndrome metabólica, uma vez que as doenças avaliadas estão relacionadas com estado pró-inflamatório e a síndrome pode ser considerada mais complexa, pois compreende o conjunto de fatores de risco, incluindo obesidade abdominal, resistência à insulina, hipertensão e dislipidemia, sendo resistência à insulina o principal fator de risco subjacente que predispõe os indivíduos ao risco aumentado de desenvolver o diabetes e doença cardiovascular (Grundy *et al.*, 2005). No presente estudo, os pacientes com síndrome metabólica obtiveram, conforme esperado, valores aumentados de peso corporal, circunferência do quadril, RCQ, percentual de gordura corporal e IMC, com conseqüente maior prevalência de obesidade, dislipidemia, hipertensão e resistência à insulina. Além disso, altas concentrações de parâmetros metabólicos, como glicose, insulina, HbA1c, HOMA-IR, bem como alterações nos biomarcadores lipídicos, incluindo altos valores de triglicérides e VLDLc, e concentrações reduzidas de HDLc e ApoA1 foram observadas em pacientes com síndrome metabólica.

Da mesma forma, a alta prevalência de componentes na síndrome metabólica, incluindo obesidade abdominal, pressão arterial elevada, HDL-C reduzido, triacilglicerol elevado, glicemia de jejum aumentada também foi demonstrada em pacientes chineses com síndrome metabólica (Guo *et al.*, 2017). Valores aumentados de circunferência da cintura e aumento da pressão arterial sistólica associados com maior glicemia de jejum, triacilglicerol e ácidos graxos livres e menores concentrações de HDL-C também foram encontradas em pacientes com síndrome metabólica (Chen e Devaraj, 2014).

Fatores de risco para DCV, como tabagismo, alcoolismo, diabetes e resistência à insulina, também foram mais prevalentes nos pacientes com síndrome metabólica. A crescente epidemia de obesidade, resistência à insulina, diabetes e, conseqüentemente, a síndrome metabólica representam um risco importante para várias comorbidades, incluindo o risco de doença aterosclerótica (González-Navarro *et al.*, 2008; Balsan *et al.*, 2015; Nazirov, 2017).

Os pacientes com síndrome metabólica, similarmente aos classificados somente baseado nos critérios de obesidade (IMC) e resistência à insulina (HOMA-IR), também apresentam variação nos valores de biomarcadores inflamatórios e de adipocitocinas, incluindo altas concentrações de PCR-us, fibrinogênio, TNF α , IL-6, PAI-1, resistina e leptina e baixas concentrações de adiponectina.

As evidências relacionando DCVs, particularmente aterosclerose, e síndrome metabólica têm sido atribuídas provavelmente à inflamação sistêmica, incluindo estado pró-inflamatório, adipocitocinas, modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR), ácidos graxos livres, marcadores de disfunção endotelial e de estado protrombótico, e hormônios do eixo hipófise-adrenal (Nazirov, 2017), assim o perfil inflamatório pode ajudar a explicar a alta prevalência de resistência à insulina em nossa população de estudo que por poderia aumentar o risco de infarto agudo do miocárdio nestes pacientes.

No entanto, quando classificados seguindo o critério de síndrome metabólica, o perfil de expressão de miRNA dos pacientes do presente estudo diferiu dos pacientes classificados somente seguindo os critérios de obesidade ou resistência à insulina. Os miRNAs: miR-542-5p, miR-424-3p, miR-326, miR-421, miR-301a-3p, miR-183-5p e miR-574-3p, foram diferentemente expressos entre indivíduos com síndrome e indivíduos saudáveis.

O miR-542-5p foi regulado positivamente em células-tronco multipotentes humanas de indivíduos com obesidade mórbida e foi associado à ativação adipogênica (Roldan *et al.*, 2011). O miR-424-3p atua como um regulador do NFIA (*nuclear factor IA*), um fator de transcrição necessário para a diferenciação adequada dos adipócitos e formação de gotículas lipídicas e foi significativamente aumentado no tecido adiposo visceral de indivíduos obesos

contribuindo para a disfunção do tecido adiposo (Kuryłowicz *et al.*, 2017). O miR-326 estava aumentado em pacientes diabéticos tipo 1 com autoimunidade permanente de ilhotas e foi associado à baixa expressão do receptor de vitamina D (VDR) em células imunes, prejudicando sua resposta na diabetes tipo 1 (Sebastiani *et al.*, 2011), enquanto o miR-574-3p foi regulado negativamente no soro de pacientes diabéticos tipo 2 e foi associado ao processo inflamatório induzido pela doença (Baldeón Rojas *et al.*, 2016).

O miR-183-5p (regulado negativamente), foi diferentemente expressos em tecido adiposo subcutâneo de obesos após perda de peso por cirurgia, quando comparado àqueles que não fizeram cirurgia, indicando que as mudanças de peso foram possivelmente responsáveis por uma regulação diferencial das vias moleculares no tecido adiposo quando o indivíduo é obeso e após o indivíduo ter perdido peso (Kuryłowicz *et al.*, 2017). O miR-130a-3p/301a-3p mostrou ter um papel na disfunção do podócito mediada por TNF- α e apoptose, na presença de alta concentração de glicose (Jiang *et al.*, 2018), bem como uma contribuição de miR-301a para a resistência à insulina induzida por IL-6 *in vivo* e *in vitro* (Dou *et al.*, 2015), enquanto o miR-421 demonstrou participar da regulação da molécula PAI-1, sugerindo perspectivas promissoras como biomarcador para distúrbios inflamatórios e trombóticos (Marchand *et al.*, 2012).

Especialmente para o miR-421, que permaneceu diferentemente expresso após confirmação em um grande número de pacientes com síndrome metabólica. Apesar de não ter sido diferentemente expresso nos pacientes obesos e/ou com resistência à insulina, curiosamente, o miR-421 foi positivamente correlacionado com HbA1c, PCR-us, IL-6 e resistina, e inversamente correlacionado com adiponectina em pacientes que atingiram o critério para síndrome metabólica, indicando um papel do miRNA no metabolismo da glicose. Além disso, a regressão linear indicou, entre outros resultados, uma influência do miR-421 nas alterações de HOMA-IR, Hb1Ac, glicose, insulina, PAI-I e LDLc, sugerindo que ele pode ter um papel na variação do perfil glicídico e conseqüentemente no risco aumentando de desenvolver resistência insulínica.

Através de estudos *in silico*, o miR-421 foi predito regular a expressão dos genes alvos *CASP3*, *MAP2K3*, *AKT3*, *CEBPB*, *PRKAA2*,

ACSL4, *PTPN11*, *MAPK14*, *IL2*, *ADIPOQ*, *PLA2G1B* relacionados as vias regulatórias relacionadas as doenças como infarto do miocárdio, obesidade, diabetes melito, esteatose hepática, tolerância a glicose, distúrbio do metabolismo da glicose, hiperglicemia e resistência à insulina, bem como atua em vias regulatórias da resposta inflamatória, sendo associado com a variabilidade na quantidade de citocinas, massa do tecido adiposo e quantidade de leptina no sangue.

Considerando o potencial papel do miR-421 na regulação do perfil glicídico de pacientes com síndrome metabólica, sua expressão foi testada em pacientes com diagnóstico de resistência à insulina. Interessantemente, sua expressão manteve-se aumentada, e apesar de não ser visto este perfil no estudo de triagem pela *PCR array*, esses resultados sugerem uma função regulatória importante a ser explorada do miR-421 na fisiopatologia da resistência à insulina e no risco de desenvolvimento de diabetes melito tipo 2.

Assim, os resultados apresentados são sugestivos de que os miRNAs-346, 483-5p, 296-3p, 1224-3p e 95-3p são importantes moléculas envolvidas em vias relacionadas as complicações da obesidade, incluindo a inflamatória e a resistência à insulina. O miR-421, no entanto, foi diferentemente expresso em uma doença metabólica mais complexa, a síndrome metabólica. Seu papel regulatório predito em vias relacionadas a inflamação, homeostase da glicose e DCV, sugerem seu um potencial papel no desenvolvimento de resistência à insulina em pacientes com síndrome metabólica, e sua aplicabilidade como biomarcador precoce de predição de risco de DCV em pacientes com síndrome metabólica mediante a presença da componente hiperglicemia.

Vários parâmetros podem ser atribuídos à nossa hipótese, incluindo: (i) o papel da adiponectina no mecanismo da resistência à insulina e no desenvolvimento da aterosclerose (Balsan *et al.*, 2015); (ii) o HOMA é um método para avaliar a função das células β e a resistência à insulina a partir das concentrações de glicose basal (em jejum) e insulina ou peptídeo C, relatadas em milhares de publicações científicas (Wallace *et al.*, 2004); (iii) As respostas inflamatórias desempenham um papel crucial na patogênese e desenvolvimento da resistência à insulina (Rehman e Akash, 2016); (iv) alta prevalência de pacientes com resistência à insulina no grupo com síndrome

metabólica; (v) miR-421 permanece com expressão aumentada nos pacientes classificados com resistência à insulina.

O estudo, apesar dos resultados promissores na busca de novos biomarcadores de diagnósticos, apresenta algumas limitações. A principal foi a não confirmação dos alvos observados na triagem pela PCR array e pacientes obesos e/ou com resistência a insulina. Apesar disso, foi realizado um estudo completo (triagem e validação) em pacientes com síndrome metabólica, que são classificados por diversos componentes, incluindo obesidade abdominal e hiperglicemia. Além disso, estudos funcionais em células hepáticas para confirmar nossas hipóteses são necessários, que não foi objetivo neste estudo, para a confirmação dos resultados obtidos, definindo uma das faces dos mecanismos fisiopatológicos que interligam as doenças metabólicas.

6. CONCLUSÕES

Os parâmetros do perfil glicídico, lipídico e inflamatório são bons marcadores de acompanhamento clínico da obesidade, resistência à insulina e síndrome metabólica e suas complicações.

Os miR-346, miR-483-5p, miR-296-3p, miR-1224-3p e miR-95-3p podem ser considerados potenciais biomarcadores preditores de DCV em pacientes obesos e resistência à insulina.

O miR-421 pode ser considerado um biomarcador precoce de predição de risco de DCV em pacientes com síndrome metabólica.

BIBLIOGRAFIA

ALESSI, M. C. et al. Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. **Diabetes**, v. 49, n. 8, p. 1374-80, Aug 2000. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10923640> >.

ANDRIKOULA, M.; MCDOWELL, I. F. The contribution of ApoB and ApoA1 measurements to cardiovascular risk assessment. **Diabetes Obes Metab**, v. 10, n. 4, p. 271-8, Apr 2008. ISSN 1463-1326. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18333887> >.

AROLA-ARNAL, A.; BLADÉ, C. Proanthocyanidins modulate microRNA expression in human HepG2 cells. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25982, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998738> >.

ARORA, S.; ANUBHUTI. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. **Neuropeptides**, v. 40, n. 6, p. 375-401, Dec 2006. ISSN 0143-4179. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16935329> >.

ARROYO, J. D. et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 12, p. 5003-8, Mar 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383194> >.

BAEK, D. et al. The impact of microRNAs on protein output. **Nature**, v. 455, n. 7209, p. 64-71, Sep 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18668037> >.

BALDEÓN ROJAS, L. et al. Study on inflammation-related genes and microRNAs, with special emphasis on the vascular repair factor HGF and miR-574-3p, in monocytes and serum of patients with T2D. **Diabetol Metab Syndr**, v. 8, p. 6, 2016. ISSN 1758-5996. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26779287> >.

BALSAN, G. A. et al. Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. **Rev Assoc Med Bras (1992)**, v. 61, n. 1, p. 72-80, 2015 Jan-Feb 2015. ISSN 1806-9282. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25909213> >.

BARROSO, T. A. et al. Association of central obesity with the incidence of cardiovascular diseases and risk factors. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, n. 5, p. 416-424, 2017. ISSN 2359-5647.

BEREZIKOV, E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. **Nat Rev Genet**, v. 12, n. 12, p. 846-60, Nov 2011. ISSN 1471-0064. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094948> >.

BERGHOFER, A. et al. Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. **Bmc Public Health**, v. 8, Jun 5 2008. ISSN 1471-2458. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000257165000002 >.

BULLÓ, M. et al. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. **Obes Res**, v. 11, n. 4, p. 525-31, Apr 2003. ISSN 1071-7323. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12690081> >.

BUSHATI, N.; COHEN, S. M. MicroRNA functions. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 23, p. 175-205, 2007 2007. ISSN 1081-0706. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000250896200008 >.

CATRYSSSE, L.; VAN LOO, G. Inflammation and the Metabolic Syndrome: The Tissue-Specific Functions of NF-κB. **Trends Cell Biol**, v. 27, n. 6, p. 417-429, 06 2017. ISSN 1879-3088. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28237661> >.

CHAKRABORTY, C. et al. Influence of miRNA in insulin signaling pathway and insulin resistance: micro-molecules with a major role in type-2 diabetes. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v. 5, n. 5, p. 697-712, 2014 Sep-Oct 2014. ISSN 1757-7012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24944010> >.

CHATKIN, R.; CHATKIN, J. M. Tabagismo e variação ponderal: a fisiopatologia e genética podem explicar esta associação? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 6, p. 712-719, 2007-12 2007. ISSN 1806-3713. Disponível em: < <Go to ISI>://SCIELO:S1806-37132007000600016 >.

CHEN, X.; DEVARAJ, S. Monocytes from metabolic syndrome subjects exhibit a proinflammatory M1 phenotype. **Metab Syndr Relat Disord**, v. 12, n. 7, p. 362-6, Sep 2014. ISSN 1557-8518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24847781> >.

CONSTANTIN, A. et al. Leptin G-2548A and leptin receptor Q223R gene polymorphisms are not associated with obesity in Romanian subjects. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 391, n. 1, p. 282-6, Jan 2010. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19913498> >.

CONSULTATION, W. H. O.; WHO. **Obesity and overweight**. ORGANIZATION, W. H. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> 2016.

CRISTÓVÃO, M. F.; SATO, A. P.; FUJIMORI, E. Overweight and abdominal obesity in women users of a Family Health Strategy Unit. **Rev Esc Enferm USP**, v. 45 Spec No 2, p. 1667-72, Dec 2011. ISSN 0080-6234. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22569652> >.

CRÉPIN, D. et al. The over-expression of miR-200a in the hypothalamus of ob/ob mice is linked to leptin and insulin signaling impairment. **Mol Cell Endocrinol**, v. 384, n. 1-2, p. 1-11, Mar 2014. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24394757> >.

DANDONA, P. et al. Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: Fall with weight loss. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83, n. 8, p. 2907-2910, Aug 1998. ISSN 0021-972X; 1945-7197. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000075265300048 >.

DANGWAL, S.; THUM, T. MicroRNAs in platelet biogenesis and function. **Thromb Haemost**, v. 108, n. 4, p. 599-604, Oct 2012. ISSN 2567-689X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782083> >.

DAOUSI, C. et al. Prevalence of obesity in type 2 diabetes in secondary care: association with cardiovascular risk factors. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, n. 966, p. 280-284, Apr 2006. ISSN 0032-5473. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000236582700011 >.

DAS, U. N. Is obesity an inflammatory condition? **Nutrition**, v. 17, n. 11-12, p. 953-66, 2001 Nov-Dec 2001. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11744348> >.

DE SOUZA, C. I. et al. Association of adipokines and adhesion molecules with indicators of obesity in women undergoing mammography screening. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, Oct 31 2012. ISSN 1743-7075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000313242200001 >.

DEHWAH, M. A. S.; XU, A.; HUANG, Q. MicroRNAs and Type 2 Diabetes/Obesity. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 39, n. 1, p. 11-18, Jan 2012. ISSN 1673-8527. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000299951000003 >.

DO PRADO, W. L. et al. Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações Práticas para a Prescrição de Exercício. **Rev Bras Med Esporte**, v. 15, p. 6, 2009.

DONATO JÚNIOR, J.; PEDROSA, R. G.; TIRAPEGUI, J. Recent aspects of body weight regulation: leptin's action on the energetic misbalance. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 273-287, 2004. ISSN 1516-9332.

DOU, L. et al. MiR-301a mediates the effect of IL-6 on the AKT/GSK pathway and hepatic glycogenesis by regulating PTEN expression. **Cell Physiol Biochem**, v. 35, n. 4, p. 1413-24, 2015. ISSN 1421-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25790935> >.

DU, T. et al. Increasing trends in central obesity among Chinese adults with normal body mass index, 1993-2009. **Bmc Public Health**, v. 13, Apr 10 2013. ISSN 1471-2458. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000317778300001 >.

DZIK, L. M. **A influência do microRNA *miR-21* no câncer de tiróide**. 2013. (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

ECKEL, R. H. et al. Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized? **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 6, p. 1654-63, Jun 2011. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21602457> >.

EL-SHAL, A. S.; PASHA, H. F.; RASHAD, N. M. Association of resistin gene polymorphisms with insulin resistance in Egyptian obese patients. **Gene**, v. 515, n. 1, p. 233-238, Feb 15 2013. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000314559400035 >.

ENGSTROM, G. et al. Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with future weight gain. **Diabetes**, v. 52, n. 8, p. 2097-2101, Aug 2003. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000184414200028 >.

ESAU, C. et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, Dec 10 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225493400079 >.

FAROOQI, I. S. Genetic, molecular and physiological insights into human obesity. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 41, n. 4, p. 451-455, Apr 2011. ISSN 0014-2972. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000288215100014 >.

FERREIRA, M. G. et al. Acurácia da circunferência da cintura e da relação cintura/quadril como preditores de dislipidemias em estudo transversal de doadores de sangue de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 2, p. 307-314, 2006-02 2006. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <Go to ISI>://SCIELO:S0102-311X2006000200008 >.

FESTA, A. et al. The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation. **International Journal of Obesity**, v. 25, n. 10, p. 1407-1415, Oct 2001. ISSN 0307-0565. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000171515800003 >.

FLEGAL, K. M. et al. Comparisons of percentage body fat, body mass index, waist circumference, and waist-stature ratio in adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 2, p. 500-508, Feb 1 2009. ISSN 0002-9165. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000262608700006 >.

FONTANA, L. et al. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. **Diabetes**, v. 56, n. 4, p. 1010-1013, Apr 2007. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000245697200013 >.

FORMAN, J. J.; LEGESSE-MILLER, A.; COLLIER, H. A. A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. **Proceedings**

of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 105, n. 39, p. 14879-14884, Sep 30 2008. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000261914300012 >.

FRANCISQUETI, F. V.; NASCIMENTO, A. F. D.; CORRÊA, C. R. Obesidade, inflamação e complicações metabólicas. **Nutrire**, p. 81-89, 2015. ISSN 1519-8928.

FRIEDEWA.WT; FREDRICK.DS; LEVY, R. I. ESTIMATION OF CONCENTRATION OF LOW-DENSITY LIPOPROTEIN CHOLESTEROL IN PLASMA, WITHOUT USE OF PREPARATIVE ULTRACENTRIFUGE. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499-&, 1972 1972. ISSN 0009-9147. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1972M604800001 >.

FRONCZYK, A. et al. Increased Concentration of C-Reactive Protein in Obese Patients with Type 2 Diabetes Is Associated with Obesity and Presence of Diabetes but Not with Macrovascular and Microvascular Complications or Glycemic Control. **Inflammation**, Oct 2013. ISSN 1573-2576. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24197824> >.

FRÜHBECK, G. et al. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 280, n. 6, p. E827-47, Jun 2001. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11350765> >.

GARFAGNINI, A. et al. Relationship between HDL-cholesterol and apolipoprotein A1 and the severity of coronary artery disease. **Eur Heart J**, v. 16, n. 4, p. 465-70, Apr 1995. ISSN 0195-668X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7671890> >.

GOGUET-RUBIO, P. et al. Existence of a Strong Correlation of Biomarkers and miRNA in Females with Metabolic Syndrome and Obesity in a Population of West Virginia. **Int J Med Sci**, v. 14, n. 6, p. 543-553, 2017. ISSN 1449-1907. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28638270> >.

GONZÁLEZ-NAVARRO, H. et al. Molecular mechanisms of atherosclerosis in metabolic syndrome: role of reduced IRS2-dependent signaling. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 12, p. 2187-94, Dec 2008. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18802016> >.

GREGG, E. W. et al. The relative contributions of different levels of overweight and obesity to the increased prevalence of diabetes in the United States: 1976-2004. **Preventive Medicine**, v. 45, n. 5, p. 348-352, Nov 2007. ISSN 0091-7435. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251563000008 >.

GRUNDY, S. M. et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. **Circulation**, v. 112, n. 17, p. 2735-2752, 2005. ISSN 0009-7322.

GUO, H. et al. Prevalence of Metabolic Syndrome and its Associated Factors among Multi-ethnic Adults in Rural Areas in Xinjiang, China. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 17643, Dec 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29247195> >.

GÜRSOY, G. et al. Relation of resistin with obesity and some cardiovascular risk fact hypertensive women. **J Res Med Sci**, v. 17, n. 5, p. 443-7, May 2012. ISSN 1735 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23626608> >.

HA, T. Y. MicroRNAs in Human Diseases: From Cancer to Cardiovascular Disease. **Immune Netw**, v. 11, n. 3, p. 135-54, Jun 2011. ISSN 2092-6685. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21860607> >.

HALBERG, N.; WERNSTEDT-ASTERHOLM, I.; SCHERER, P. E. The adipocyte as an endocrine cell. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 37, n. 3, p. 753-68, x-xi, Sep 2008. ISSN 0889-8529. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18775362> >.

HE, F. et al. Predictive value of circulating miR-328 and miR-134 for acute myocardial infarction. **Mol Cell Biochem**, v. 394, n. 1-2, p. 137-44, Sep 2014. ISSN 1573-4919. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24833470> >.

HERRERA, B. M.; KEILDSON, S.; LINDGREN, C. M. Genetics and epigenetics of obesity. **Maturitas**, v. 69, n. 1, p. 41-9, May 2011. ISSN 1873-4111. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21466928> >.

HINUUY, H. M. et al. Leptin G-2548A promoter polymorphism is associated with increased plasma leptin and BMI in Brazilian women. **Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia**, v. 52, n. 4, p. 611-616, Jun 2008. ISSN 0004-2730. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000257287100006 >.

_____. Relationship between variants of the leptin gene and obesity and metabolic biomarkers in Brazilian individuals. **Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia**, v. 54, n. 3, p. 282-288, Apr 2010. ISSN 0004-2730. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000278067300006 >.

HOSSAIN, P.; KAWAR, B.; NAHAS, M. E. Obesity and diabetes in the developing world - A growing challenge. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 3, p. 213-215, Jan 18 2007. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243488100003 >.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860-7, Dec 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17167474> >.

HRUBY, A.; HU, F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. **Pharmacoeconomics**, v. 33, n. 7, p. 673-89, Jul 2015. ISSN 1179-2027. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25471927> >.

HU, Z. Insight into microRNA regulation by analyzing the characteristics of their targets in humans. **Bmc Genomics**, v. 10, Dec 10 2009. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273355200001 >.

IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF**. 2011.

_____. **Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF**. 2015.

IHARA, S. et al. An alpha1-receptor blocker reduces plasma leptin levels in hypertensive patients with obesity and hyperleptinemia. **Hypertens Res**, v. 29, n. 10, p. 805-11, Oct 2006. ISSN 0916-9636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17283868> >.

ITO, S. et al. Increased plasma sphingosine-1-phosphate in obese individuals and its capacity to increase the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in adipocytes. **Coronary Artery Disease**, v. 24, n. 8, p. 642-650, Dec 2013. ISSN 0954-6928; 1473-5830. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000326972000004 >.

JAMES, W. P. T. The epidemiology of obesity: the size of the problem. **Journal of Internal Medicine**, v. 263, n. 4, p. 336-352, Apr 2008. ISSN 0954-6820; 1365-2796. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000253759900002 >.

JIANG, Y. et al. Overexpression of miR-130a-3p/301a-3p attenuates high glucose-induced MPC5 podocyte dysfunction through suppression of TNF- α signaling. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 15, n. 1, p. 1021-1028, 2018. ISSN 1792-0981.

JONES, A. et al. miRNA Signatures of Insulin Resistance in Obesity. **Obesity (Silver Spring)**, v. 25, n. 10, p. 1734-1744, 10 2017. ISSN 1930-739X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28834285> >.

JÚNIOR, J. D.; PEDROSA, R. G.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais da regulação do peso corporal: ação da leptina no desequilíbrio energético. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 3, p. 15, 2004.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840-846, Dec 14 2006. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000242805400040 >.

KAROLINA, D. S. et al. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 12, p. E2271-6, Dec 2012. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23032062> >.

KELLY, D. A. The use of anti-interleukin-2 receptor antibodies in pediatric liver transplantation. **Pediatr Transplant**, v. 5, n. 6, p. 386-9, Dec 2001. ISSN 1397-3142. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11737761> >.

KENNY, S. et al. Gastric Expression of Plasminogen Activator Inhibitor (PAI)-1 Is Assoc with Hyperphagia and Obesity in Mice. **Endocrinology**, v. 154, n. 2, p. 718-726, Feb 2013. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000313959800017 >.

KIM, C. S. et al. Prevalence, awareness, and management of obesity in Korea: data from the Korea national health and nutrition examination survey (1998-2011). **Diabetes Metab J**, v. 38, n. 1, p. 35-43, Feb 2014. ISSN 2233-6079. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24627826> >.

KIM, J. J.; SEARS, D. D. TLR4 and Insulin Resistance. **Gastroenterol Res Pract**, v. 2010, 2010. ISSN 1687-630X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20814545> >.

KLOK, M. D.; JAKOBSDOTTIR, S.; DRENT, M. L. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: A review. **Obesity Reviews**, v. 8, n. 1, p. 21-34, Jan 2007. ISSN 1467-7881. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243841100005 >.

KLÖTING, N. et al. MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. **PLoS One**, v. 4, n. 3, p. e4699, 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19259271> >.

KNIGHT, Z. A. et al. Hyperleptinemia Is Required for the Development of Leptin Resistance. **Plos One**, v. 5, n. 6, Jun 29 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000279369900023 >.

KORNER, J. et al. Prospective study of gut hormone and metabolic changes after adjustable gastric banding and Roux-en-Y gastric bypass. **International Journal of Obesity**, v. 33, n. 7, p. 786-795, Jul 2009. ISSN 0307-0565. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000267948800010 >.

KORNER, J.; WOODS, S. C.; WOODWORTH, K. A. Regulation of energy homeostasis and health consequences in obesity. **Am J Med**, v. 122, n. 4 Suppl 1, p. S12-8, Apr 2009. ISSN 1555-7162. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19410672> >.

KURYŁOWICZ, A. et al. NGS Reveals Molecular Pathways Affected by Obesity and Weight Loss-Related Changes in miRNA Levels in Adipose Tissue. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 1, Dec 2017. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29280944> >.

LAFONTAN, M. Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 45, p. 119-46, 2005. ISSN 0362-1642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15822173> >.

LAKOSKI, S. G. et al. The relationship between inflammation, obesity and risk for hypertension in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). **J Hum Hypertens**, v. 25, n. 2, p. 73-81, 2011. ISSN 1476-5527. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20944659> >.

LEE, H. et al. Increased leptin and decreased ghrelin level after smoking cessation. **Neuroscience Letters**, v. 409, n. 1, p. 47-51, Nov 27 2006. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000242101800010 >.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. THE C-ELEGANS HETEROCHRONIC GENE LIN-4 ENCODES SMALL RNAs WITH ANTISENSE COMPLEMENTARITY TO LIN-14. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, Dec 3 1993. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993MK96600005 >.

LI, H. et al. MicroRNA-296: a promising target in the pathogenesis of atherosclerosis? **Mol Med**, v. 24, n. 1, p. 12, Mar 2018. ISSN 1528-3658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30134788> >.

LIANG, Y. et al. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. **BMC Genomics**, v. 8, p. 166, 2007. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17565689> >.

LIN, Q. et al. A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. **Febs Journal**, v. 276, n. 8, p. 2348-2358, Apr 2009. ISSN 1742-464X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000264546200020 >.

LINDOW, M.; GORODKIN, J. Principles and limitations of computational microRNA gene and target finding. **DNA and Cell Biology**, v. 26, n. 5, p. 339-351, May 2007. ISSN 1044-5498. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246496400007 >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C) method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000173949500003 >.

LOWDON, R. F.; JANG, H. S.; WANG, T. Evolution of Epigenetic Regulation in Vertebrate Genomes. **Trends Genet**, v. 32, n. 5, p. 269-283, 05 2016. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27080453> >.

LUC, G. et al. Value of HDL cholesterol, apolipoprotein A-I, lipoprotein A-I, and lipoprotein A-I/A-II in prediction of coronary heart disease: the PRIME Study. *Prospective Epidemiological*

Study of Myocardial Infarction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 22, n. 7, p. 1155-61, Jul 2002. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12117731> >.

LUO, X.; YANG, B.; NATTEL, S. MicroRNAs and atrial fibrillation: mechanisms and translational potential. **Nat Rev Cardiol**, v. 12, n. 2, p. 80-90, Feb 2015. ISSN 1759-5010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25421165> >.

MA, F. et al. The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses during intracellular bacterial infection by targeting interferon-gamma. **Nature Immunology**, v. 12, n. 9, p. 861-U5, Sep 2011. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000294461200010 >.

MA, N. et al. Coexpression of an intronic microRNA and its host gene reveals a potential role for miR-483-5p as an IGF2 partner. **Mol Cell Endocrinol**, v. 333, n. 1, p. 96-101, Feb 2011. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21146586> >.

MARCHAND, A. et al. miR-421 and miR-30c inhibit SERPINE 1 gene expression in human endothelial cells. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e44532, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22952991> >.

MARCHI-ALVES, L. M. et al. Leptin, obesity and hypertension: importance of nursing actions. **Acta Paulista De Enfermagem**, v. 23, n. 2, p. 286-290, Mar-Apr 2010. ISSN 0103-2100. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000277421900021 >.

MATTHEWS, D. R. et al. **Homeostasis model assement: insulin resistance and β cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man**: Diabetologia: 412-419 p. 1985.

MCGREGOR, R. A.; CHOI, M. S. microRNAs in the Regulation of Adipogenesis and Obesity. **Current Molecular Medicine**, v. 11, n. 4, Jun 2011. ISSN 1566-5240. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292183700004 >.

MELLO, M. M.; STUDDERT, D. M.; BRENNAN, T. A. Obesity - The new frontier of public health law. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 24, p. 2601-2610, Jun 15 2006. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000238233400014 >.

MONROIG, P. D.; CALIN, G. A. MicroRNA and Epigenetics: Diagnostic and Therapeutic Opportunities. **Curr Pathobiol Rep**, v. 1, n. 1, p. 43-52, Mar 2013. ISSN 2167-485X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23515489> >.

MONTEIRO, J. C. **Obesidade: diagnóstico, métodos e fundamentos**. São Paulo: Lemos Editorial: 31-53 p. 1998.

MOSCHEN, A. R. et al. Anti-inflammatory effects of excessive weight loss: potent suppression of adipose interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha expression. **Gut**, v. 59, n. 9, p. 1259-1264, Sep 2010. ISSN 0017-5749. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000282187100021 >.

MURPHY, K.; BLOOM, S. Gut hormones in the control of appetite. **Experimental physiology**, v. 89, n. 5, p. 507-516, 2004. ISSN 1469-445X.

MURPHY, K. G.; DHILLO, W. S.; BLOOM, S. R. Gut peptides in the regulation of food intake energy homeostasis. **Endocr Rev**, v. 27, n. 7, p. 719-27, Dec 2006. ISSN 0163-769X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17077190>>.

NAZIROV, F. G. K., Z. R. SHARAPOV, N. U. **Atherosclerosis and Metabolic Syndrome-significance of Inflammation,**

Urgency of Weight Loss and Extracorporeal Removal of Proinflammatory and Proatherogenic Substances. KHAYBULLINA ZR, S. N. 6 2017.

NGUYEN, N. T. et al. Association of hypertension, diabetes, dyslipidemia, and metabolic syndrome with obesity: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2004. **J Am Coll Surg**, v. 207, n. 6, p. 928-34, Dec 2008. ISSN 1879-1190. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19183541>>.

O'BRIEN, T. et al. The role of lipoprotein A-I and lipoprotein A-I/A-II in predicting coronary artery disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 15, n. 2, p. 228-31, Feb 1995. ISSN 1079-5642. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7749830>>.

OGDEN, C. L. et al. Prevalence of Childhood and Adult Obesity in the United States, 2011-2012. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 311, n. 8, p. 806-814, Feb 26 2014. ISSN 0098-7484; 1538-3598. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000331793700020 >.

ORTEGA, F. J. et al. Targeting the circulating microRNA signature of obesity. **Clin Chem**, v. 59, n. 5, p. 781-92, May 2013. ISSN 1530-8561. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23396142>>.

OSKOWITZ, A. Z. et al. Human multipotent stromal cells from bone marrow and microRNA: regulation of differentiation and leukemia inhibitory factor expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 47, p. 18372-7, Nov 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19011087>>.

PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 12, p. 1805-1812, Jun 2003. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000183623600002 >.

PERMANA, P. A.; MENGE, C.; REAVEN, P. D. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 341, n. 2, p. 507-14, Mar 2006. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16427608> >.

PERRY, B.; WANG, Y. Appetite regulation and weight control: the role of gut hormones. **Nutrition & diabetes**, v. 2, n. 1, p. e26, 2012. ISSN 2044-4052.

PINKNEY, J. Prevention and cure of type 2 diabetes - Weight loss is the key to controlling diabetes epidemic. **British Medical Journal**, v. 325, n. 7358, p. 232-233, Aug 3 2002. ISSN 0959-535X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000177339000004 >.

PLUVINET, R. et al. RNAi-mediated silencing of CD40 prevents leukocyte adhesion on CD154-activated endothelial cells. **Blood**, v. 104, n. 12, Dec 1 2004. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225351600042 >.

PRITCHARD, C. C.; CHENG, H. H.; TEWARI, M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 5, p. 358-369, May 2012. ISSN 1471-0056. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000303045400012 >.

RAITOHARJU, E. et al. miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. **Atherosclerosis**, v. 219, n. 1, p. 211-217, Nov 2011. ISSN 0021-9150. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000296587200032 >.

RAJ, M.; KUMAR, R. K. Obesity in children & adolescents. **Indian Journal of Medical Research**, v. 132, n. 5, p. 598-607, Nov 2010. ISSN 0971-5916. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000285033100020 >.

REHMAN, K.; AKASH, M. S. Mechanisms of inflammatory responses and development of insulin resistance: how are they interlinked? **J Biomed Sci**, v. 23, n. 1, p. 87, Dec 2016. ISSN 1423-0127. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27912756> >.

ROLDAN, M. et al. Obesity short-circuits stemness gene network in human adipose multipotent stem cells. **FASEB J**, v. 25, n. 12, p. 4111-26, Dec 2011. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21846837> >.

ROME, S. Are extracellular microRNAs involved in type 2 diabetes and related pathologies? **Clin Biochem**, v. 46, n. 10-11, p. 937-45, Jul 2013. ISSN 1873-2933. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23499584> >.

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 85-91, 2006-02 2006. ISSN 1415-5273. Disponível em: < <Go to ISI>://SCIELO:S1415-52732006000100009 >.

SAINI, H. K.; GRIFFITHS-JONES, S.; ENRIGHT, A. J. Genomic analysis of human microRNA transcripts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 45, p. 17719-24, Nov 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965236> >.

SAINI, V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **World J Diabetes**, v. 1, n. 3, p. 68-75, Jul 2010. ISSN 1948-9358. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537430> >.

SANZ, J.; MORENO, P. R.; FUSTER, V. The year in atherothrombosis. **J Am Coll Cardiol**, v. 51, n. 9, p. 944-55, Mar 2008. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18308164> >.

SARTORELLI, D. S.; FRANCO, L. J. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. S29-S36, 2003 2003. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <Go to ISI>://SCIELO:S0102-311X2003000700004 >.

SCHERER, P. E. et al. A NOVEL SERUM-PROTEIN SIMILAR TO C1Q, PRODUCED EXCLUSIVELY IN ADIPOCYTES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 45, p. 26746-26749, Nov 10 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995TE58300007 >.

SEBASTIANI, G. et al. Increased expression of microRNA miR-326 in type 1 diabetic patients with ongoing islet autoimmunity. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 27, n. 8, p. 862-6, Nov 2011. ISSN 1520-7560. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22069274> >.

SELL, H.; DIETZE-SCHROEDER, D.; ECKEL, J. The adipocyte-myocyte axis in insulin resistance. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, n. 10, p. 416-422, Dec 2006. ISSN 1043-2760. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243054200013 >.

SHULDINER, A. R. Obesity Genes and Gene-Environment-Behavior Interactions: Recommendations for a Way Forward. **Obesity**, v. 16, p. S79-S81, Dec 2008. ISSN 1930-7381. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261406200014 >.

SILHA, J. V. et al. Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. **European Journal of Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 331-335, Oct 2003. ISSN 0804-4643. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000185849400010 >.

SOUZA, M. D. G. D. et al. Prevalência de obesidade e síndrome metabólica em frequentadores de um parque. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 28, p. 31-35, 2015. ISSN 0102-6720.

STEMBURGO, T.; DE AZEVEDO, M. J.; ALFREDO MARTINEZ, J. Gene-nutrient interaction and its association with obesity and diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E**

Metabologia, v. 53, n. 5, p. 497-508, Jul 2009. ISSN 0004-2730. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268846000003 >.

STEPIEN, M. et al. Serum concentrations of adiponectin, leptin, resistin, ghrelin and insulin and their association with obesity indices in obese normo- and hypertensive patients - pilot study. **Archives of Medical Science**, v. 8, n. 3, p. 431-436, Jun 2012. ISSN 1734-1922. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000306150200007 >.

STEPAN, C. M. et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, n. 6816, p. 307-312, Jan 18 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166434300037 >.

STERN, S. E. et al. Identification of individuals with insulin resistance using routine clinical measurements. **Diabetes**, v. 54, n. 2, p. 333-9, Feb 2005. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15677489> >.

STUNKARD, A. J.; FOCH, T. T.; HRUBEC, Z. A TWIN STUDY OF HUMAN OBESITY. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 256, n. 1, p. 51-54, Jul 4 1986. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986C935200016 >.

STUNKARD, A. J. et al. THE BODY-MASS INDEX OF TWINS WHO HAVE BEEN REARED APART. **New England Journal of Medicine**, v. 322, n. 21, p. 1483-1487, May 24 1990. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1990DE23700002 >.

SURIYAPROM, K.; TUNGTRONGCHITR, R.; THAWNASOM, K. Measurement of the levels of leptin, BDNF associated with polymorphisms LEP G2548A, LEPR Gln223Arg and BDNF Val66Met in Thai with metabolic syndrome. **Diabetol Metab Syndr**, v. 6, n. 1, p. 6, 2014. ISSN 1758-5996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24444121> >.

TAUBES, G. **Prosperity's plague**: American Association for the Advancement of Science 2009.

TAVARES, V. et al. Association between Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma 2 gene and insulin sensitivity in Brazilian patients with type-2 diabetes mellitus. **Diabetes Obesity & Metabolism**, v. 7, n. 5, p. 605-611, Sep 2005. ISSN 1462-8902. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000230886000017 >.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 772-783, Oct 2006. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241251500016 >.

TRAYHURN, P.; WANG, B.; WOOD, I. S. Comment on: Hosagai et al. (2007) Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation: **Diabetes** 56:901-911. **Diabetes**, v. 56, n. 9, p. e14, Sep 2007. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17726133> >.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **British Journal of Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 347-355, Sep 2004. ISSN 0007-1145. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000224519100002 >.

TSCHÖP, M.; MORRISON, K. M. Weight loss at high altitude. In: (Ed.). **Hypoxia**: Springer, p.237-247.

TURCHINOVICH, A. et al. Characterization of extracellular circulating microRNA. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. 16, p. 7223-33, Sep 2011. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21609964> >.

VAN DER MERWE, M. T.; PEPPER, M. S. Obesity in South Africa. **Obesity Reviews**, v. 7, n. 4, p. 315-322, Nov 2006. ISSN 1467-7881. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241190200001 >.

VAN ROOIJ, E.; PURCELL, A. L.; LEVIN, A. A. Developing microRNA therapeutics. **Circ Res**, v. 110, n. 3, p. 496-507, Feb 2012. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22302756> >.

VENDRELL, J. et al. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: Relationships in obesity. **Obesity Research**, v. 12, n. 6, p. 962-971, Jun 2004. ISSN 1071-7323. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222547800012 >.

VIGITEL. **Mais da metade dos brasileiros está com excesso de peso**. SAÚDE, M. D. <http://www.brasil.gov.br/saude/2015/04/metade-dos-brasileiros-esta-com-excesso-de-peso> 2018.

VISONE, R.; CROCE, C. M. MiRNAs and Cancer. **American Journal of Pathology**, v. 174, n. 4, p. 1131-1138, Apr 2009. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000264657800001 >.

WAJCHENBERG, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocrine reviews**, v. 21, n. 6, p. 697-738, 2000. ISSN 0163-769X.

WALLACE, T. M.; LEVY, J. C.; MATTHEWS, D. R. Use and abuse of HOMA modeling. **Diabetes Care**, v. 27, n. 6, p. 1487-95, Jun 2004. ISSN 0149-5992. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15161807> >.

WANG, R. et al. Elevated circulating microRNA-122 is associated with obesity and insulin resistance in young adults. **Eur J Endocrinol**, v. 172, n. 3, p. 291-300, Mar 2015. ISSN 1479-683X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25515554> >.

WEYER, C. et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: Close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 5, p. 1930-1935, May 2001. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168731600018 >.

WHO. Obesity: Preventing and managing the global epidemic - Introduction. **Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic: Report of a Who Consultation**, v. 894 253, 2000. ISSN 0512-3054. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168728400001 >.

_____. Obesity and overweight. **Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic: Report of a Who Consultation**, 2018.

WILLIAMSON, D. F. et al. Smoking cessation and severity of weight gain in a national cohort. **N Engl J Med**, v. 324, n. 11, p. 739-45, Mar 1991. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1997840> >.

XIE, H.; SUN, L.; LODISH, H. F. Targeting microRNAs in obesity. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 13, n. 10, Oct 2009. ISSN 1472-8222.

XU, B. et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. **Nat Neurosci**, v. 6, n. 7, p. 736-42, Jul 2003. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12796784> >.

YAMAUCHI, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. **Nature Medicine**, v. 7, n. 8, p. 941-946, Aug 2001. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000171740400032 >.

YANG, W. M.; MIN, K. H.; LEE, W. MicroRNA expression analysis in the liver of high fat diet-induced obese mice. **Data Brief**, v. 9, p. 1155-1159, Dec 2016. ISSN 2352-3409. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27995171> >.

YANG, X. et al. [New-generation high-throughput technologies based 'omics' research strategy in human disease]. **Yi Chuan**, v. 33, n. 8, p. 829-46, Aug 2011. ISSN 0253-9772. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21831800> >.

YANOVSKI, S. Z.; YANOVSKI, J. A. Toward Precision Approaches for the Prevention and Treatment of Obesity. **JAMA**, v. 319, n. 3, p. 223-224, 01 2018. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29340687> >.

YUDKIN, J. S. et al. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 19, n. 4, p. 972-8, Apr 1999. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10195925> >.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-32, Dec 1994. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984236> >.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SERVIÇOS DA SAÚDE
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa:

“Estudo dos polimorfismos dos genes CD40, ICAM1, VCAM1, E-selectina, LIGHT, RAGE e CX3CR1 relacionados com inflamação e sua associação ao sobrepeso corporal.”

Dados de identificação do voluntário da pesquisa

Nome do voluntário: _____

Documento de identidade Nº: _____ Sexo: M F

Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____ no. ____ apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Telefone: _____

Prezado(a) Voluntário(a),

Meu nome é Mario Hiroyuki Hirata, sou professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) e estou convidando você para participar do projeto de pesquisa que estou desenvolvendo com a equipe de médicos do Setor de Dislipidemia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) e com a colaboração de outros pesquisadores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Para participar desta pesquisa precisarei do seu consentimento e amostras de sangue que serão coletadas no Setor de Coleta do Laboratório Clínico ou no Setor de Dislipidemia. O risco à saúde será mínimo e a coleta de sangue pode formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

Nesta pesquisa, vamos fazer testes de RNA e de DNA em alguns genes que estão relacionados com inflamação, e aterosclerose (CD40, ICAM1, VCAM1, E-selectina, LIGHT, RAGE e CX3CR1), ou seja, para estudar a relação entre alterações nas seqüências do DNA (polimorfismos genéticos) e a expressão de RNAm que possam estar relacionados com o aumento de peso.

Além disso, realizaremos exames de sangue (glicemia, hemoglobina glicada, colesterol total + frações, triglicérides, apolipoproteína A e B, hemograma completo, T4, TSH, creatinina, uréia, AST, ALT e proteína C reativa ultra-sensível). Para estes procedimentos, serão coletados aproximadamente 48 mL de sangue.

A sua amostra de DNA será armazenada no Laboratório de Biologia Molecular aplicada ao Diagnóstico (LBMAD) da FCF/USP, sob minha responsabilidade, e será mantida em banco de materiais biológicos sem a sua identificação. Se futuramente sua amostra for utilizada em outro projeto, este novo projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e então, alguém entrará em contato com você para solicitar autorização.

Os resultados obtidos durante a pesquisa serão **confidenciais** e somente serão revelados a terceiros com sua autorização. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados desta pesquisa forem publicados em artigos de revistas científicas ou forem apresentados em temas de aulas e debates.

Comitê de Ética do IDPC

Av. Dr. Dante Pazzanese 500, Ibirapuera,

CEP: 04012-180, São Paulo, SP

Telefones: 5085-6040

Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Cidade Universitária

CEP: 05508-900, São Paulo, SP

Telefone: 3091-3677

Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
Comitê de Ética em Pesquisa
Av. Dr. Dante Pazzanese, 500 - 6º andar - Torre



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SERVIÇOS DA SAÚDE
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR



Você receberá todos os resultados dos exames laboratoriais necessários sem qualquer custo e, caso se interesse, você terá acesso aos resultados dos testes genéticos no final da pesquisa.

Sua participação neste estudo é voluntária, portanto, não receberá qualquer pagamento por sua participação. Por quaisquer motivos, independente de seu consentimento, os membros da equipe podem encerrar sua participação no estudo devido a alguma alteração médica que pode colocá-lo em risco de outra complicação, devido ao cancelamento do estudo pela coordenação do mesmo, caso o sujeito não cumpra as orientações ou por outras questões administrativas. Caso isso ocorra um dos pesquisadores entrará em contato e lhe explicará o motivo da exclusão.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem penalidade ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico no Instituto Dante Pazzanese (IDPC) não será afetado. Caso você desista de participar da pesquisa, poderá solicitar a retirada de seus dados genéticos do banco de dados do LBMAD da FCF/USP.

Não há benefício direto aos participantes da pesquisa, porém os resultados deste estudo vão ajudar para uma melhor conduta terapêutica no caso de obesidade.

Em caso de dúvida ou desistência, você poderá entrar em contato com os pesquisadores: Aécio Braga (telefone: 7556-0272), Paula Lima (telefone: 5085-6086) ou Mario Hiroyuki Hirata (telefone: 3091-3660) a qualquer hora do dia.

Eu, _____ declaro que, após bem esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito, voluntariamente, em participar desta pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do voluntário(a)

Assinatura do Pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Você autoriza o armazenamento do DNA para pesquisas futuras? Sim () Não ()

.....
Comitê de Ética do IDPC
Av. Dr. Dante Pazzanese 500, Ibirapuera,
CEP: 04012-180, São Paulo, SP
Telefones: 5085-6040

.....
Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Cidade Universitária
CEP: 05508-900, São Paulo, SP
Telefone: 3091-3677

APÊNDICE B – FICHA DE COLETA DE DADOS INDIVIDUAIS

INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA (IDPC) E FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (FCF/USP)

FICHA PARA COLETA DE DADOS INDIVIDUAIS DO PACIENTE

Nome: _____		Paciente n.º _____
Data do convite: ____/____/____		Registro n.º _____
Data de nascimento: ____/____/____		
Sexo: <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Feminino		Menopausa: <input type="checkbox"/> Pré <input type="checkbox"/> Pós
Etnia: <input type="checkbox"/> Branca <input type="checkbox"/> Parda <input type="checkbox"/> Negra <input type="checkbox"/> Amarela		
Hábito de fumar: <input type="checkbox"/> Nunca fumou <input type="checkbox"/> Parou de fumar <input type="checkbox"/> Há quanto tempo? _____		
<input type="checkbox"/> Fuma n.º de cigarros/dia _____		
Consome bebida alcoólica? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
<input type="checkbox"/> Até 7 doses/sem. <input type="checkbox"/> Mais de 7 doses/sem.		
Possui algum tipo de doença? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Qual(is)? _____		
<input type="checkbox"/> Diabetes Mellitus		
Já teve infarto? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Há quanto tempo? _____		
É hipertenso? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Medida de Pressão arterial: _____ (mmHg)		
É obeso? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Peso (Kg) _____ Altura (cm) _____ IMC: _____		
Toma medicamentos? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Qual(is)? Em que dosagem? _____		
Profissão: _____ Há exigência de esforço físico? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Pratica exercício físico? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Parentes obesos?		
Doenças relacionadas com obesidade secundária:		
HISTÓRICO FAMILIAR		

INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA (IDPC) E FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (FCF/USP)

Possui algum parente (pai, mãe ou irmão) com:
<input type="checkbox"/> Diabete Mellitus <input type="checkbox"/> Obesidade <input type="checkbox"/> Hipertensão
<input type="checkbox"/> Doenças cardiovascular Quem? _____
<input type="checkbox"/> Hipercolesterolemia Quem? _____
<input type="checkbox"/> Não tem <input type="checkbox"/> Não sabe
DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

Data:	Data:	Data:
GLI	Peso:	Pressão arterial diastólica:
CT	Altura:	Pressão arterial sistólica:
TG	IMC:	
HDL-C	Cintura:	
LDL-C	Quadril	
VLDL-C	Bioimpedancia	

CT: colesterol total/ GLI: glicemia/ TG: triglicédeos

ANEXOS

**ANEXO A – CÓPIA DO AVAL DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA
FCF-USP E DO IDPC**



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

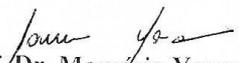
Ofício CEP/FCF ~~31.2013-P591~~ P585

São Paulo, 27 de novembro de 2013.

Prezada Senhora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em reunião realizada em 25 de novembro de 2013, **APROVOU** as alterações ao projeto de pesquisa “Estudo dos polimorfismos dos genes CD40, ICAM1, VCAM1, E-selectina, LIGHT, RAGE, e CX3CR1 relacionados com inflamação e sua associação ao sobrepeso corporal” (P585), que consistem de inclusão de análise de miRNA em um subprojeto, conforme apresentado por Vossa Senhoria.

Cordialmente,


Prof. Dr. Maurício Yonamine
Coordenador do CEP/FCF/USP

Ilma. Sra.
Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata
FCF/FCF/USP



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa



Ao

Prof. Mario Hiroyuki Hirata

Investigador Principal

Nº DO PROTOCOLO NO CEP: 4134

(este nº. deverá citar nas correspondências referentes a este projeto)

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo

Instituição Coparticipante: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

CEP: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

Referente: Emenda/ TCLE

Projeto de Pesquisa Clínica: "Estudo dos polimorfismos dos genes CD40, ICAM1, VCAM1, E-selectina, LIGHT, RAGE e CX3CR1 relacionados com inflamação e sua associação ao sobrepeso corporal".

Metodologia original: "Estudo dos polimorfismos dos genes CD40, ICAM1, VCAM1, E-selectina, LIGHT, RAGE e CX3CR1 relacionados com inflamação e sua associação ao sobrepeso corporal".

Metodologia atual: "Estudo dos polimorfismos dos genes CD40, ICAM1, VCAM1, E-selectina, LIGHT, RAGE e CX3CR1 relacionados com inflamação e sua associação ao sobrepeso corporal e pesquisa de biomarcadores moleculares na síndrome metabólica pelo miRNOMA sanguíneo e sua aplicação como fator de risco cardiovascular".

Justificativa das alterações: A inclusão justifica-se pela importância dos miRNAs na fisiopatologia das coronariopatias e na interação com diversos fatores de risco de DAC, obesidade, resistência à insulina e dislipidemia. Porém, ainda é pouco conhecido o papel de miRNAs na evolução da síndrome metabólica e da DAC, assim como o prognóstico e a resposta ao tratamento. Portanto é de interesse



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa



estudar o perfil de expressão global de microRNAs em pacientes com e sem DAC, com o objetivo de estabelecer a associação entre epigenômica (representado pelos miRNAs) e o processo evolutivo da doença aterosclerótica.

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia diante de suas atribuições analisou e aprovou a emenda ao projeto de pesquisa supracitado.

Pedro Silvio Farsky
Coordenador CEP
CRM 55073

Dr. Pedro Silvio Farsky
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

São Paulo, 07 de outubro de 2014.

ANEXO B – FICHA DO ALUNO

30/09/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 7060081/2 - Aécio Assunção Braga

Email: aeciobraga@usp.br
Data de Nascimento: 20/01/1986
Cédula de Identidade: RG - 54.836.549-0 - SP
Local de Nascimento: Estado do Maranhão
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade Federal do Maranhão - Maranhão - Brasil - 2009
Mestrado: Mestre em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2014

Curso: Doutorado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 23/05/2014
Início da Contagem de Prazo: 23/05/2014
Data Limite para o Depósito: 20/09/2018
Orientador: Prof(a). Dr(a). Mario Hiroyuki Hirata - 23/05/2014 até o presente. Email: mhirata@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 23/05/2014
Prorrogação(ões): 120 dias
Período de 23/05/2018 até 20/09/2018
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 11/08/2016
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 23/05/2014
Prorrogação em 10/05/2018

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2018

Impresso em: 30/09/2018 06:14:05



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 7060081/2 - Aécio Assunção Braga

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5786-4/1	Tópicos em Análises Clínicas IV	05/08/2014	17/11/2014	15	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBA5728-3/10	Aprimoramento Didático	19/08/2014	15/09/2014	60	4	75	B	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0518 Biologia Molecular Aplicada e Farmacogenômica, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/02/2015	30/06/2015	-	3	-	-	-	-
FBC5792-3/2	Tópicos em Análises Clínicas III	03/03/2015	16/06/2015	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5786-4/2	Tópicos em Análises Clínicas IV	04/08/2015	16/11/2015	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5748-4/2	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	05/04/2016	17/05/2016	60	4	100	A	N	Concluída
MCM5725-6/3	Aspectos Atuais do Metabolismo de Lípidos (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	31/10/2016	04/12/2016	60	4	100	A	N	Concluída
MCP5835-3/6	Princípios de Análise de Dados e de Bioestatística (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	06/03/2017	19/03/2017	60	4	90	A	N	Concluída
MCP5867-1/3	Bases Fisiopatológicas e Prática Clínica da Hipertensão Arterial (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	03/04/2017	09/04/2017	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MCM5913-1/2	Diabetes Mellitus e suas Complicações: Aspectos Metabólicos e Epigenéticos. (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	08/05/2017	28/05/2017	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MCP5871-1/4	Tratamento de Dados em Estudo Científico (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	28/06/2017	02/07/2017	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	23
Estágios:			
Total:	0	20	23

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 12/04/2017.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018