



UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Investigação da expressão de microRNAs no tecido adiposo e de variações em genes de adipocinas nas alterações presentes na obesidade humana.

ALINE SIMAS GASPAROTTO

Orientadora: Prof^a Dr^a Vanessa Suñé Mattevi

Porto Alegre, 2016

Aline Simas Gasparotto

**Investigação da expressão de
microRNAs no tecido adiposo e de
variações em genes de adipocinas
nas alterações presentes na
obesidade humana.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vanessa Suñé Mattevi

Porto Alegre, 2016

Catálogo na Publicação

Gasparotto, Aline Simas

Investigação da expressão de microRNAs no tecido adiposo e de variações em genes de adipocinas nas alterações presentes na obesidade humana / Aline Simas Gasparotto. -- 2016.

90 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Vanessa Suñé Mattevi.

1. Obesidade. 2. Tecido adiposo. 3. Polimorfismo. 4. microRNAs. 5. Adipocinas. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

À minha orientadora da tese, Dr^a Vanessa Suñé Mattevi, por mais uma oportunidade de crescimento acadêmico e profissional, e pela confiança para iniciarmos as pesquisas com microRNAs na UFCSPA.

À minha orientadora do programa REUNI, Dr^a Liane Nanci Rotta, por me acolher em suas disciplinas e me guiar no caminho da docência de forma tão clara e entusiasmada.

Às equipes cirúrgicas e aos pacientes envolvidos, pela confiança e participação no nosso estudo.

Aos colegas, Diego e Marina, pelo auxílio durante as coletas e experimentos. E aos demais, pela amizade e companhia dentro e fora do laboratório.

Aos meus pais Edi e Mara, e à minha irmã, Isabella, por todo amor e suporte de sempre. E ao meu marido, Lucas, pelo incentivo, companheirismo e pelas dicas estatísticas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo investimento utilizado para a realização do nosso projeto de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) juntamente com a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) pela bolsa REUNI e oportunidade no programa de iniciação à docência.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar
uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl J. Jung

Sumário

Resumo	6
Abstract	7
1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Etiologia e consequências do problema	8
1.2 O tecido adiposo branco	10
1.3. Adipocinas	14
1.4 Angiogênese e obesidade	18
1.5 Inflamação e obesidade.....	22
1.6 MicroRNAs.....	25
1.6.1. Critérios para seleção dos microRNAs.....	28
2 Objetivos	31
2.1 Geral.....	31
2.2 Específicos	31
3 Referências citadas na introdução	32
Artigo 1	41
Artigo 2.....	59
4 CONCLUSÃO.....	82
Anexo I – Aprovação no CEP da UFCSPA	85
Anexo II – Aprovação no CEP da ISCMPA	85
Anexo III – Aprovação no CEP do GHC.....	89
Anexo IV – Aprovação de adendo submetido ao CEP do GHC	90

Resumo

Nas últimas décadas, a obesidade se tornou um importante problema de saúde pública nas sociedades industrializadas. Com o objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos na patofisiologia da obesidade, a expressão de microRNAs (miRNAs) que têm por alvo genes envolvidos nos processos angiogênico, inflamatório e metabólico do tecido adiposo subcutâneo foi comparada entre 40 mulheres obesas e não-obesas através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Além disso, 60 indivíduos submetidos à cirurgia bariátrica foram genotipados para variantes localizadas nas regiões promotoras de genes de adipocinas e foi investigada a sua possível associação com a redução de medidas antropométricas e metabólicas entre 2 e 3 anos após a realização da intervenção cirúrgica. O miR-16 apresentou uma expressão cerca de 150 vezes superior no tecido adiposo de mulheres não-obesas. Além disso, a expressão de dois outros miRNAs (miR-27b e miR-424-5p) foi correlacionada com diferentes medidas antropométricas em mulheres não-obesas e obesas. Os miR-16 e miR-424 possuem como genes alvo o fator de crescimento endotelial vascular e seus cofatores, sugerindo que eles possam estar envolvidos nas alterações angiogênicas observadas na obesidade. No grupo de indivíduos submetidos à cirurgia bariátrica, foram analisados polimorfismos localizados nos genes codificadores das adipocinas leptina, resistina e adiponectina (*ADIPOQ*). Os portadores da combinação dos alelos A do polimorfismo *ADIPOQ* -11391G>A e do alelo C *ADIPOQ* -11377 C>G apresentaram maior redução nos níveis de colesterol total, e lipoproteína de baixa densidade. Esses resultados sugerem que tanto miRNAs como polimorfismos genéticos estão associados ao risco de desenvolvimento da obesidade e/ou alterações metabólicas relacionadas.

Palavras-chave: tecido adiposo; obesidade; cirurgia bariátrica; miR-16; miR-424; adipocinas

Abstract

In the last decades, obesity has become an important burden to public health in the industrialized societies. To disclose the mechanisms surrounding obesity, miRNAs that target genes involved in angiogenesis, inflammation and adipogenesis were selected and their expression in subcutaneous adipose tissue was compared between 40 obese and non-obese women by real-time polymerase chain reaction (qPCR). Furthermore, 60 subjects who underwent bariatric surgery were genotyped for variants located in the promoter regions of adipokine genes and the possible association with changes in anthropometric and metabolic measurements after 2 to 3 years of surgery. miR-16 was overexpressed in the non-obese women group. Additionally, the expression of miR-27b and miR-424-5p was significantly correlated with different anthropometric measures in obese and non-obese women. Both miR-16 and miR-424 have vascular endothelial growth factor and its receptors as target genes, suggesting they may be involved in the alterations of angiogenesis observed in obesity. In the group of patients who underwent bariatric surgery, polymorphisms located in the genes encoding the adipokines leptin, resistin and adiponectin (*ADIPOQ*) were analyzed. Carriers of the combinations of the A allele for the *ADIPOQ* -11391 G>A and the C allele for *ADIPOQ* -11377 C>G presented a higher reduction in total cholesterol and low-density lipoprotein levels. These results suggest that miRNAs and genetic polymorphisms are associated with the risk of development of obesity and/or related metabolic disturbances.

Keywords: Adipose tissue; obesity; bariatric surgery; microRNA; miR-16; miR-424; adipokines

1 INTRODUÇÃO

1.1 Etiologia e consequências do problema

Desde as últimas décadas, a obesidade e suas consequências têm se tornado um grande problema de saúde pública mundial, sendo responsáveis por uma redução da expectativa e da qualidade de vida (TRAYHURN, BING *et al.*, 2006; KRZYSZTOSZEK, WIERZEJSKA *et al.*, 2015). O excesso de peso e a obesidade são ambas categorias que designam faixas de peso acima do que é considerado saudável para uma determinada altura. Os termos também identificam faixas de peso que têm sido relacionadas à maior probabilidade de desenvolvimento de certas patologias, como as doenças cardiovasculares, por exemplo. Para adultos, o excesso de peso é caracterizado por um índice de massa corporal (IMC, definido como a massa, em kg, dividida pelo quadrado da altura, em m) entre 25 e 29,9 kg/m²; já a obesidade, por um IMC igual ou maior a 30 kg/m² (WHO, acessada em janeiro de 2016).

A obesidade ocorre quando a ingestão excede o gasto de energia. Este excesso é estocado como triglicerídeos nos adipócitos, os quais aumentam tanto em número (hiperplasia), quanto em tamanho (hipertrofia) (ALEXANDER, LODISH *et al.*, 2011). Embora a etiologia desta doença não esteja totalmente esclarecida, existe consenso na literatura de que ela é causada pela interação de diferentes fatores que levam a um desequilíbrio energético como, por exemplo, características genéticas, culturais, comportamentais, ambientais, metabólicas e socioeconômicas, o que confere a essa enfermidade uma natureza multifatorial (KOPELMAN, 2000; BENGMARK, 2015).

Há anos, a obesidade tem se apresentado como um agravo importante para as sociedades modernas em face de seu avanço em diferentes partes do mundo. Entretanto, sabe-se que a pandemia da obesidade não é exclusiva do mundo industrializado. Países em desenvolvimento são fortemente afetados por essa tendência devido ao aumento do consumo de alimentos industrializados, jornada de trabalho extenuante, dispositivos eletrônicos que poupam movimentos, falta de atividade física, entre outros (PRENTICE, 2006; BENGMARK, 2015). Estes países são pouco equipados para conter essas tendências, o que favorece o desenvolvimento de anormalidades metabólicas.

Mais de dois terços dos norte-americanos adultos e a maioria do restante da população ocidental adulta apresentam sobrepeso ou obesidade (OGDEN, CARROLL *et al.*, 2014). De acordo com o *Center for Disease Control* dos Estados Unidos (CDC), em 2003 os custos de despesas médicas relacionadas ao sobrepeso e à obesidade no país foram de aproximadamente US\$75 bilhões, enquanto que os últimos valores relatados referentes ao ano de 2008 alcançaram a quantia dos US\$147 bilhões (CDC, acessado em dezembro de 2015). De forma semelhante, observa-se uma inversão dos indicadores nutricionais no Brasil, caracterizada pelo declínio substancial da desnutrição e em contrapartida pela ascensão da obesidade, de tal forma que a obesidade já se apresenta como o maior problema alimentar da população brasileira (FERREIRA e MAGALHÃES, 2006). Na mesma direção, a região Sul do Brasil apresenta a prevalência de 56,08% de adultos com excesso de peso (ABESO, acessado em dezembro de 2015).

Como mencionado anteriormente, além do desconforto físico e psicológico, o excesso de peso aumenta o risco de inúmeros problemas, incluindo hipertensão, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, diabetes tipo II, certos tipos de cânceres, doenças respiratórias, cálculos biliares e osteoartrite (ALLENDER e RAYNER, 2007). Assim, a obesidade é frequentemente associada com anormalidades metabólicas como intolerância à glicose, hiperinsulinemia, dislipidemia com níveis elevados de triglicerídeos, concentrações baixas de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e aumento da proporção de pequenas lipopartículas densas (OHMAN, SHEN *et al.*, 2008; TSENG, CYPESS *et al.*, 2010). Este conjunto de distúrbios metabólicos é chamado de síndrome metabólica (SM) e representa fatores de risco conhecidos para doença cardiovascular (NCEP, 2002). Além disso, indivíduos obesos de qualquer idade frequentemente sofrem de problemas psicológicos, como depressão e baixa autoestima (CAO, 2010). Logo, a obesidade afeta negativamente ao mesmo tempo o funcionamento físico, a vitalidade e a qualidade de vida em geral (KOPELMAN, 2000; ROTH, QIANG *et al.*, 2004; BENGMARK, 2015), o que a torna um grande problema a ser solucionado pelas sociedades atuais.

1.2 O tecido adiposo branco

Até o final dos anos 1980, o tecido adiposo era considerado um simples órgão de armazenamento de lipídeos. Entretanto, evidências posteriores estabeleceram que este tecido é um órgão secretor, com poder de influenciar todo o metabolismo sistêmico (KERSHAW e FLIER, 2004). Além disso, depósitos distintos deste tecido executam papéis específicos. Nos mamíferos,

além do tecido adiposo branco (TAB), encontramos os tecidos adiposos marrom e bege (Figura 1).

O tecido adiposo marrom (TAM) é responsável por gerar calor (termogênese), aumentando assim o consumo de energia e exercendo sua principal função de manutenção da temperatura corporal em neonatos (HARMS e SEALE, 2013). A permanência deste tecido em adultos ainda é discutida. Fisiologicamente, os adipócitos marrons possuem gotículas de gordura multilocular e alta concentração de mitocôndrias, característica esta que originou seu nome (revisão em KIM e PLUTZKY, 2016).

Mais recentemente, os adipócitos do tecido adiposo bege foram descritos como muito semelhantes aos do tecido marrom e emergindo em resposta a vários estímulos, incluindo exposição prolongada ao frio. Juntos, os dois são conhecidos como tecidos termogênicos e causam hidrólise dos triglicerídeos estocados e captura de lipídeos e glicose da circulação sanguínea (revisão em SCHEJA e HEEREN, 2016).

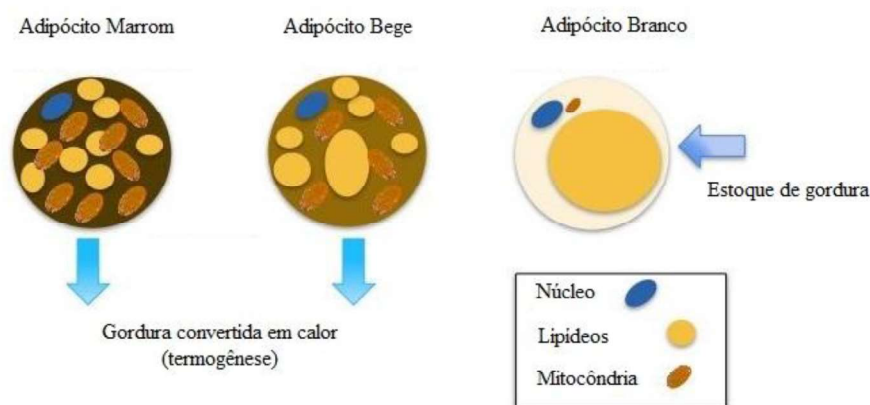


Figura 1. Adaptada de (TRAN, MUKHERJEE *et al.*, 2016)

O alvo da nossa pesquisa, o TAB já é reconhecido como um regulador – chave da homeostase energética, não apenas devido ao fato de funcionar como depósito de energia química, mas também devido a sua produção de múltiplas citocinas com atividades que influenciam todo o metabolismo corporal. Apesar de seu peso ser constituído em 85% por triacilgliceróis, sua simplicidade, entretanto, é ilusória (TRAYHURN, BING *et al.*, 2006; PROENCA, SERTIE *et al.*, 2014).

No nível celular, há considerável heterogeneidade, com adipócitos maduros sendo responsáveis por não mais da metade do conteúdo celular do tecido adiposo branco. O tecido também contém fibroblastos, células endoteliais, pré – adipócitos e macrófagos, por exemplo (WEISBERG, MCCANN *et al.*, 2003; XU, BARNES *et al.*, 2003; PROENCA, SERTIE *et al.*, 2014). Depois que ocorre o comprometimento das células tronco mesenquimais multipotentes com a linhagem adipocitária, os pré – adipócitos adquirem morfologia de adipócitos maduros, expressando marcadores específicos como a proteína ligante de ácidos graxos – 4 (FABP4) e o facilitador do transporte de glicose – 4 (GLUT4). Hormonalmente induzidos, os pré - adipócitos entram de novo no ciclo celular e passam por alguns ciclos de expansão mitótica antes de adquirir a maquinaria celular responsável para estoque lipídico e metabolismo. O receptor ativado pela proliferação dos peroxissomos γ (PPAR γ) é o principal regulador transcricional da adipogênese, ativando genes envolvidos na diferenciação terminal e maturação das funções dos adipócitos. Além disso, membros da família de proteínas que aumentam a ligação a CCAAT (C/EBP) também são importantes na adipogênese (revisão

em (ALEXANDER, LODISH *et al.*, 2011). A complexidade do TAB também é evidente em processos básicos, como o transporte de glicose para dentro dos adipócitos, o qual conta com 14 membros da família do gene GLUT (WOOD e TRAYHURN, 2003; PROENCA, SERTIE *et al.*, 2014). Outra proteína com atuação importante é a sirtuína 1 (SIRT1), a qual reprime a transativação do PPAR γ e inibe o acúmulo de lipídeos nos adipócitos. Esta sirtuína também desempenha papel importante na regulação da homeostase energética em resposta à disponibilidade de nutrientes. Dados sugerem que SIRT1 esteja envolvida na regulação de doenças metabólicas associadas à obesidade, através da regulação de PGC-1a (coativador do PPAR γ), UCP2 (proteína desacopladora 2) e LXR (receptor X do fígado; revisão em RAHMAN e ISLAM, 2011). Em adipócitos diferenciados, um aumento dos níveis de SIRT1 desencadeia lipólise e perda de gordura (PICARD, KURTEV *et al.*, 2004).

Somando-se a isso, o TAB é um órgão secretor importante, atuando principalmente através da liberação de ácidos graxos durante o jejum. O tecido também libera outros lipídeos, como colesterol, retinol, hormônios esteroides e prostaglandinas. O colesterol e o retinol não são produzidos pelo tecido, mas absorvidos e armazenados no mesmo (TRAYHURN e BEATTIE, 2001). Além disso, a enzima lipoproteína lipase (LPL) é liberada pelos adipócitos para quebrar triacilgliceróis circulantes em ácidos graxos, os quais são subsequentemente estocados dentro das células adiposas (TRAYHURN, BING *et al.*, 2006; PROENCA, SERTIE *et al.*, 2014).

1.3. Adipocinas

Os adipócitos brancos secretam inúmeras proteínas sinalizadoras e fatores, denominados adipocinas (FRUHBECK, GOMEZ-AMBROSI *et al.*, 2001; TRAYHURN e BEATTIE, 2001; RAJALA e SCHERER, 2003). Esse grupo é composto por mais de 600 moléculas bioativas que atuam como hormônios endócrinos e parácrinos (BLUHER, 2014). A diversidade de adipocinas é considerável tanto em termos de estrutura, quanto em função proteica. Essas moléculas englobam as citocinas clássicas (ex., fator de necrose tumoral, TNF- α , interleucina – 6, IL-6), quimiocinas (ex., proteína quimioatrativa de monócito 1, MCP-1), proteínas do sistema complemento alternativo (ex., adipsina) e proteínas envolvendo a homeostase vascular (ex., inibidor do ativador de plasminogênio - 1, PAI-1), regulação da pressão sanguínea (ex., angiotensinogênio), metabolismo lipídico (ex., proteína ligadora de retinol), homeostase da glicose (ex., adiponectina) e angiogênese (ex., fator de crescimento endotelial vascular – A, VEGF-A) (CHEN, CHEN *et al.*, 2015; XU, KITADE *et al.*, 2015).

No estado “obeso”, o crescimento excessivo do tecido adiposo altera a secreção das adipocinas, o que gera uma cascata de distúrbios metabólicos associados (LEAL VDE e MAFRA, 2013). Algumas das principais moléculas descritas nesse processo são a leptina, a adiponectina e a resistina (Figura 2).

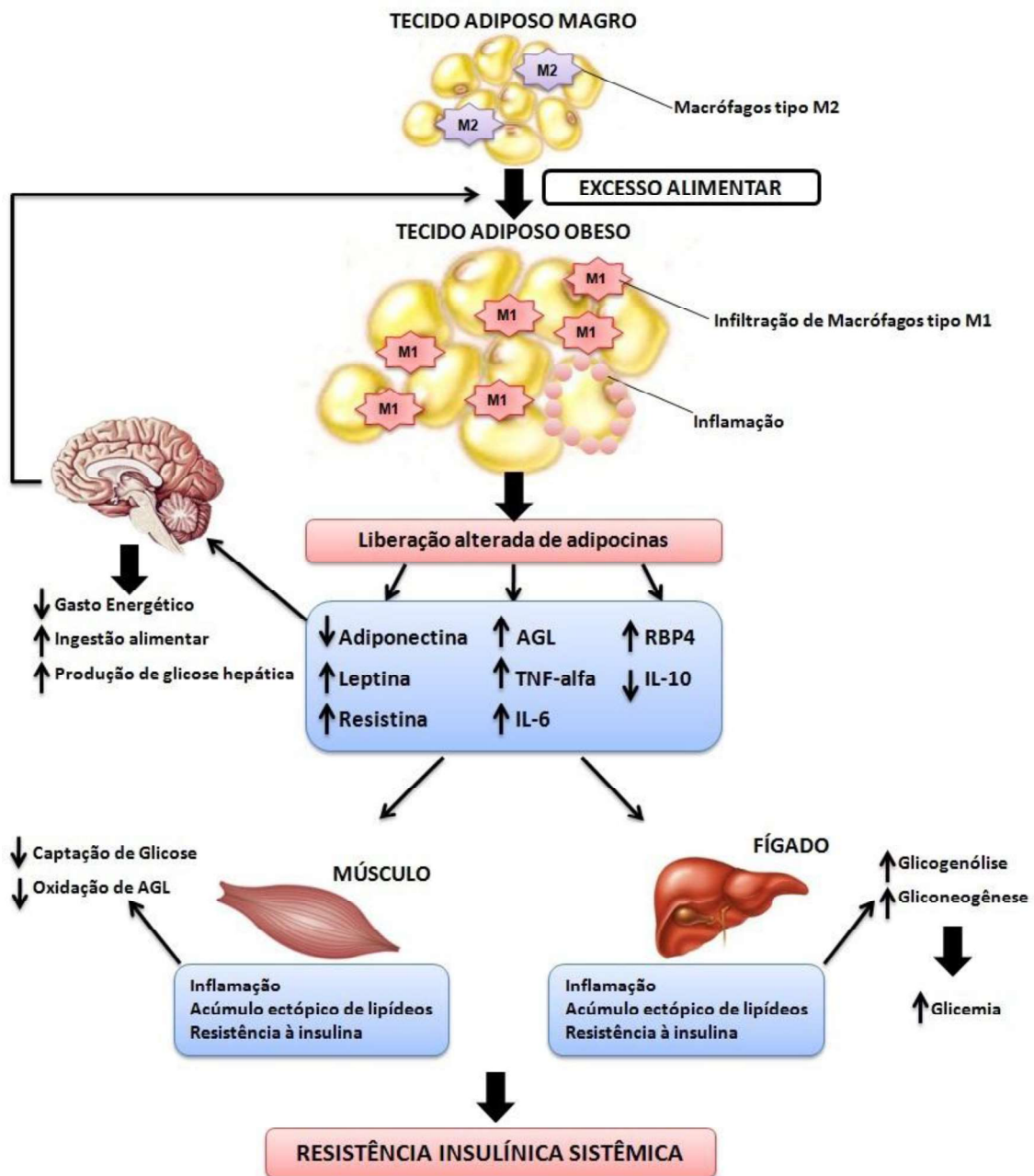


Figura 2. A hipertrofia do tecido adiposo induz a infiltração e proliferação de macrófagos e alteração na secreção de adipocinas levando à inflamação crônica de baixa intensidade. Este quadro, associado ao aumento de ácidos graxos livres circulantes, provoca aumento de ingestão alimentar, diminuição do gasto energético, além da alteração na homeostase de tecidos periféricos, como músculo e fígado, promovendo acúmulo ectópico de gordura, inflamação e resistência à insulina. AGL: ácidos graxos livres, TNF-alfa: fator de necrose tumoral alfa, IL-6: interleucina 6, RBP4: proteína ligante de retinol, IL-10: interleucina 10, Extraído de: (SPERETTA, LEITE *et al.*, 2014).

A leptina, predominantemente secretada pelos adipócitos subcutâneos, é um exemplo de adipocina que tem seus níveis regulados pela massa de tecido adiposo e pelo *status* nutricional do indivíduo (FAIN, MADAN *et al.*, 2004). Essa adipocina atua primariamente regulando a homeostase energética através do controle da saciedade e do peso corporal por neurônios sensíveis à leptina encontrados no hipotálamo (ELMQUIST, ELIAS *et al.*, 1999; MORTON, CUMMINGS *et al.*, 2006). Assim, elevados níveis de leptina circulante refletem em resistência a essa adipocina, além de hiperfagia e aumento da adiposidade (LEAL VDE e MAFRA, 2013). Além disso, sabe-se que a severidade da obesidade está diretamente relacionada aos níveis de leptina circulantes (CONSIDINE, SINHA *et al.*, 1996; CAMPFIELD, SMITH *et al.*, 1996). Resultados obtidos pelo presente grupo de pesquisa em uma amostra de 325 crianças associaram o polimorfismo Gln223Arg (rs1137101) no gene do receptor de leptina (*LEPR*) com o total de energia consumida diariamente aos 3-4 anos de idade (ZANDONA, RODRIGUES *et al.*, 2013). Outra variante (*LEP*, rs7799039) já foi associada à percepção de saciedade e a ingesta alimentar (diferente em homozigotos AA quando comparados aos portadores do alelo G) em um grupo de homens com sobrepeso (DOUGKAS, YAQOOB *et al.*, 2013). Além disso, foi observado em indivíduos indianos com sobrepeso que homozigotos AA para esta variante apresentaram maior IMC (DASGUPTA, SALMAN *et al.*, 2015).

A adiponectina é a adipocina mais abundantemente expressa no TAB (FAIN, MADAN *et al.*, 2004). Ao contrário da leptina, os níveis de adiponectina diminuem antes do início da obesidade e da resistência à insulina (AHIMA, 2006). Acredita-se que a relação inversa da adiponectina com a obesidade e a

resistência insulínica seja crucial para o desenvolvimento dessas patologias (AHIMA, 2006). No mesmo estudo referido anteriormente realizado em uma coorte de crianças (ZANDONA, RODRIGUES *et al.*, 2013), homozigotos para o alelo G do SNP *APM1* -11377C>G (rs266729) na região promotora do gene da adiponectina apresentaram níveis significativamente maiores de colesterol total e LDL quando comparados aos homozigotos C/C antes da correção para múltiplos testes (correção de Bonferroni). Além disso, o SNP *APM1* -11391G>A (rs17300539) também foi associado a níveis de energia ingerida durante o primeiro ano de idade, gordura subcutânea, níveis de glicemia e colesterol HDL aos quatro anos de idade, apesar de os valores de P não terem se mantido significativos após a correção de Bonferroni. Em um estudo prévio do presente grupo em 410 pacientes vivendo com HIV e sob terapia antirretroviral, os alelos A (*ADIPOQ* -11391) e C (*ADIPOQ* -11377) foram associados a níveis plasmáticos mais elevados de adiponectina (TRINCA, SPRINZ *et al.*, 2010). Em um estudo posterior, o presente grupo associou polimorfismos no receptor de adiponectina (*ADIPOR2*, rs11061925 e rs929434) com parâmetros bioquímicos, como níveis de triglicérides, adiponectina, colesterol total e glicemia em 222 homens HIV-positivos sob terapia antirretroviral (CASTILHOS, SPRINZ *et al.*, 2015). Uma meta-análise realizada para esclarecer a associação de polimorfismos do gene *ADIPOQ* com a obesidade mostrou que a variante rs17300539 está associada ao risco para a população caucasiana e a variante rs266729, para a população asiática (LU, ZHOU *et al.*, 2014).

A resistina, por sua vez, é secretada por macrófagos no TAB humano, com efeitos biológicos nos distúrbios homeostáticos da glicemia. Altos níveis

desse peptídeo estão associados à resistência insulínica, ao aumento do risco cardiovascular, à disfunção endotelial e ao aumento de marcadores pró-inflamatórios, por exemplo (FONSECA-ALANIZ, TAKADA *et al.*, 2007; SCHWARTZ e LAZAR, 2011). Outro estudo realizado por membros do presente grupo (MATTEVI, ZEMBRZUSKI *et al.*, 2004) associou o alelo G do polimorfismo na região 5' do gene da resistina (*RETN* -420 C>G) com medidas menores de IMC e circunferência de cintura em mulheres pré-menopáusicas quando comparadas às homozigotas C/C. Por outro lado, outros dois estudos não encontraram associação deste SNP com IMC em mulheres belgas (BECKERS, PEETERS *et al.*, 2008) e em homens dinamarqueses (BECKERS, ZEGERS *et al.*, 2013).

1.4 Angiogênese e obesidade

Diferente da maioria dos tecidos, o adiposo continua a se expandir e regredir durante a vida adulta. A expansão do tecido adiposo pode ser permitida tanto por neovascularização (no caso de hiperplasia dos adipócitos) quanto por dilatação e remodelamento da rede capilar existente (para hipertrofia dos adipócitos) (HAUSMAN e KAUFFMAN, 1986). Portanto, a adipogênese (formação dos adipócitos) está fortemente associada à angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) (CHRISTIAENS e LIJNEN, 2010). De fato, a angiogênese tem sido mostrada como tendo papel crucial na modulação da adipogênese e da obesidade (CAO, 2007; LIJNEN, 2008; PARK, LEE *et al.*, 2015).

Um sistema vascular bem definido está presente no tecido adiposo, onde cada adipócito é envolto por um estroma vascular contendo pré-adipócitos, células endoteliais, perócitos, fibroblastos, macrófagos e células-tronco mesenquimais (CAO, BRAKENHIELM *et al.*, 2001). No tecido adiposo em crescimento, vasos angiogênicos contribuem para a adipogênese através de inúmeros mecanismos, a saber: 1º) suprem o tecido com nutrientes, oxigênio e plasma, o qual é enriquecido por fatores de crescimento e citocinas; 2º) fornecem células-tronco circulantes, que são capazes de diferenciarem-se em pré – adipócitos; 3º) facilitam a infiltração de monócitos e neutrófilos, o que aumenta o número de células inflamatórias; 4º) células endoteliais ativadas desses vasos angiogênicos produzem vários fatores de crescimento e citocinas, que se comunicam de forma parácrina com os adipócitos promovendo aumento e expansão dos mesmos; 5º) removem resíduos do tecido; 6º) a vascularização do tecido consiste em microvasos fenestrados que podem ser fundamentais para determinar efeitos locais ou sistêmicos das adipocinas (revisão em CAO, 2010).

Tanto o TAB quanto o TAM produzem e secretam diferentes tipos de fatores pró - angiogênicos, como o VEGF-A e o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), ambos os fatores angiogênicos chave produzidos pelos adipócitos. Outros fatores derivados do tecido adiposo que possuem efeito semelhante são o VEGF-B e -C, fator de crescimento placentário (PIGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF)-2, angiopoetina (Ang)-1 e -2, leptina, fator de crescimento transformador (TGF)- β , TNF- α , entre outros. O tecido adiposo também produz fatores antiangiogênicos, como a adiponectina e

trombospondina (TSP)-1 e -2, por exemplo. Porém, o papel da adiponectina é controverso, pois a mesma já foi descrita como promotora da angiogênese (LANDSKRONER-EIGER, QIAN *et al.*, 2009). Portanto, a regulação da angiogênese no tecido adiposo depende do equilíbrio local de fatores pró- e antiangiogênicos, dependendo do contexto em diferentes depósitos de gordura (CHRISTIAENS e LIJNEN, 2010).

O VEGF é expresso tanto na fração de células estroma - vasculares, quanto em adipócitos maduros, descrito em animais e humanos (LEDOUX, QUEGUINER *et al.*, 2008). Um dos cinco membros da família VEGF, o VEGF-A, estimula tanto a angiogênese fisiológica quanto a patológica através de sinalização pelo receptor de fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR)-2 de maneira estritamente dose-dependente. A perda de um único alelo do VEGF-A causa defeito vascular embriônico (CARMELIET, FERREIRA *et al.*, 1996). Assim, acredita-se que o VEGF-A seja responsável pela maior capacidade angiogênica do tecido adiposo (ZHANG, MAGOVERN *et al.*, 1997; HOLMES, ROBERTS *et al.*, 2007). Um estudo (NISHIMURA, MANABE *et al.*, 2007) mostrou que o uso de um anticorpo anti-VEGF inibiu não apenas a angiogênese, mas também a formação de grupamentos de células adipo/angiogênicas, indicando que o acoplamento da adipogênese e da angiogênese é essencial para a diferenciação de adipócitos na obesidade, e confirmando o VEGF como um mediador chave. A participação do VEGF na angiogênese do tecido adiposo também foi evidenciada para tecido humano, usando anticorpos anti-VEGF (LEDOUX, QUEGUINER *et al.*, 2008).

Já o FGF-2 é um potente estimulador da diferenciação, migração e proliferação de células endoteliais (PRESTA, DELL'ERA *et al.*, 2005), e aumenta a diferenciação *in vivo* de adipócitos (KAWAGUCHI, TORIYAMA *et al.*, 1998). Durante a angiogênese, o FGF-2 estimula a síntese de proteinases, como a colagenase e uroquinase ativadora de plasminogênio (u-PA), e de integrinas para formar novas estruturas de cordões capilares (OKAMURA, SATO *et al.*, 1991).

Outro fator de crescimento, o TGF- β , é uma citocina multifuncional capaz de regular o crescimento e diferenciação de muitos tipos celulares. Esta citocina está implicada em vários processos biológicos, incluindo adesão e migração, produção de matriz extracelular, remodelamento de tecido e reparo de dano (MCCARTNEY-FRANCIS e WAHL, 1994; ZAMANI e BROWN, 2011). Níveis de RNAm de TGF- β estão aumentados em adipócitos maduros e nas frações celulares estromal/vascular de tecido adiposo de camundongos obesos. A expressão aumentada de TGF- β no tecido adiposo pode levar ao aumento da proliferação de células precursoras de adipócitos, assim contribuindo para o excesso de células em depósitos de gordura associados ao fenótipo da obesidade (SAMAD, YAMAMOTO *et al.*, 1997).

Além dos adipócitos, outros tipos celulares como células inflamatórias e estromais do tecido adiposo também contribuem substancialmente para a angiogênese. A hipóxia no tecido adiposo de indivíduos obesos também tem um papel causal no desencadeamento da inflamação e da angiogênese (CAO, 2010). Portanto, levando-se em consideração que a obesidade e quase todas

as desordens relacionadas a ela são associadas a distúrbios na angiogênese, uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos pode levar a uma melhora na abordagem terapêutica deste desequilíbrio energético.

1.5 Inflamação e obesidade

A invasão de depósitos adipocitários por macrófagos é uma característica fundamental do tecido adiposo obeso que contribui para a sua adaptação às condições energéticas, como hipóxia e tensão mecânica (devidos à hipertrofia). A infiltração dos macrófagos remove as células mortas e também expõe os adipócitos a citocinas inflamatórias que promovem a “anti - adipogênese”, ou desmontagem da morfologia e função distintas dos adipócitos para aliviar a tensão do excessivo acúmulo de lipídeos (RUAN, HACOHEN *et al.*, 2002). Esta infiltração também promove a vascularização do tecido adiposo (PANG, GAO *et al.*, 2008). Portanto, essa mudança dinâmica observada no tecido adiposo pode ser referida como remodelamento do tecido adiposo (SUGANAMI e OGAWA, 2010). O número de macrófagos presente no TAB está diretamente correlacionado com a adiposidade e com o tamanho do adipócito, tanto em camundongos quanto em humanos, não havendo diferença significativa na presença entre os TAB visceral e subcutâneo (WEISBERG, MCCANN *et al.*, 2003; CURAT, MIRANVILLE *et al.*, 2004).

O gene PBX/knotted 1 homeobox 1 (*PKNOX1*) codifica uma proteína crucial na regulação da polarização macrocitária. Esse gene foi associado à resposta inflamatória no tecido adiposo e à resistência insulínica sistêmica em camundongos (ZHUANG, MENG *et al.*, 2012).

O TNF- α é uma importante citocina inflamatória secretada pelos macrófagos que atua como regulador negativo da adipogênese, podendo também regular vários processos biológicos, como a função imune, diferenciação celular, proliferação, apoptose e metabolismo energético (KRIEGLER, PEREZ *et al.*, 1988; CILDIR, AKINCILAR *et al.*, 2013). A expressão ectópica de TNF- α estimula a inflamação crônica no tecido adiposo obeso através do bloqueio da expressão de genes adipogênicos, particularmente o PPAR γ , C/EBP α e o FABP4 (CAWTHORN, HEYD *et al.*, 2007), e pela indução da expressão de marcadores pré - adipocitários (SHOELSON, LEE *et al.*, 2006). Além disso, a ação do TNF- α no tecido adiposo pode alterar a produção de inúmeras adipocinas e isto se torna relevante para os efeitos sistêmicos desta citocina na sensibilidade à insulina e na homeostase energética corporal (CAWTHORN e SETHI, 2008; CILDIR, AKINCILAR *et al.*, 2013). Ainda, a citocina está envolvida em um ciclo vicioso que amplia as mudanças inflamatórias no tecido adiposo. O TNF- α , que em grande parte é derivado de macrófagos infiltrados no tecido adiposo obeso, atua em seus receptores nos adipócitos hipertrofiados induzindo, portanto, a produção de citocinas pró-inflamatórias e a lipólise em adipócitos (SUGANAMI, NISHIDA *et al.*, 2005). Por outro lado, os ácidos graxos saturados, então liberados, servem como ligantes naturais para o complexo TLR4 (*toll-like receptor 4*), o que é essencial para o reconhecimento da LPL para induzir a ativação em macrófagos (SUGANAMI, TANIMOTO-KOYAMA *et al.*, 2007).

Assim como o TNF- α , a IL-6 também é conhecida por estar envolvida na regulação da sinalização da insulina e do metabolismo lipídico. De modo semelhante, os macrófagos contribuem aproximadamente em 50% na produção de IL-6 do TAB (WEISBERG, MCCANN *et al.*, 2003). Níveis séricos de IL-6 foram correlacionados positivamente com o grau de obesidade (SKURK, ALBERTI-HUBER *et al.*, 2007). Além disso, altos níveis desta citocina em obesos podem ser responsáveis pelo aumento de proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa (FANTUZZI, 2005). Contudo, o papel metabólico da IL-6 é considerado controverso devido a suas múltiplas funções, incluindo efeitos tecido-específicos no metabolismo da glicose e na sinalização insulínica (SABIO e DAVIS, 2010).

Outra proteína produzida em grandes quantidades na obesidade humana e que governa a secreção de IL-1 β e IL-1Ra, é o receptor purinérgico P2X (*P2RX7*) (GLAS, SAUTER *et al.*, 2009). Esse receptor é responsável pela lise ATP-dependente de macrófagos, regulando a permeabilidade celular, liberação de citocinas e apoptose (NARCISSE, SCEMES *et al.*, 2005). Níveis séricos elevados de IL-1Ra já foram correlacionados com obesidade e resistência insulínica (MEIER, BOBBIONI *et al.*, 2002; ABBATECOLA, FERRUCCI *et al.*, 2004; SALMENNIEMI, RUOTSALAINEN *et al.*, 2004) (RUOTSALAINEN, SALMENNIEMI *et al.*, 2006).

Somando-se a essas informações, existe considerável evidência para o papel patofisiológico da via da proteína MCP-1 e do receptor de quimiocinas (motivo C-C) 2 (CCR2) na infiltração de macrófagos no tecido adiposo

(WEISBERG, HUNTER *et al.*, 2006; KAMEI, TOBE *et al.*, 2006; ITO, SUGANAMI *et al.*, 2008; XU, KITADE *et al.*, 2015). Os adipócitos são uma fonte importante de MCP-1 e causam inflamação no tecido adiposo mesmo na ausência de macrófagos (SINDHU, THOMAS *et al.*, 2015). Logo, a MCP-1 adipocitária tem papel crucial na resistência insulínica de indivíduos obesos (UCHIDA, TAKESHITA *et al.*, 2012). Além disso, dois estudos prévios com superexpressão transgênica de MCP-1 em tecido adiposo e com camundongos deficientes de MCP-1 (MCP-1^{-/-}) mostraram que a proteína exerce papel importante no recrutamento de macrófagos em tecido adiposo obeso (KANANDA, TATEYA *et al.*, 2006; KAMEI, TOBE *et al.*, 2006).

A inibição da infiltração de macrófagos no tecido adiposo, mediante estratégias genéticas ou farmacológicas, melhora a desregulação da produção de adipocinas levando, portanto, a uma melhora da inflamação do tecido adiposo induzida pela obesidade e da resistência insulínica (SUGANAMI e OGAWA, 2010). Além disso, a inflamação crônica altera os níveis de microRNAs em células imunes (LODISH, ZHOU *et al.*, 2008; GE, BRICHARD *et al.*, 2014).

1.6 MicroRNAs

Sabe-se que mais de 80% do genoma humano pode ser transcrito, porém, menos de 2% apresenta capacidade de codificar proteínas (DJEBALI, DAVIS *et al.*, 2012). Logo, fica claro que a diversidade das regiões não codificadoras do genoma é fundamental para a complexidade funcional dos organismos (GERSTEIN, KUNDAJE *et al.*, 2012).

Os microRNAs são uma classe de pequenos RNAs (aproximadamente 22 nucleotídeos) não - codificantes que são reconhecidos como alvos terapêuticos viáveis para uma série de doenças (ALEXANDER, LODISH *et al.*, 2011; OLIVE, MINELLA *et al.*, 2015). Frequentemente referidos como “microgerentes” da expressão gênica, os microRNAs são evolutivamente bem conservados e, ligando-se ao transcrito – alvo na região 3’ não traduzida do gene (3’UTR), podem inibir a tradução de proteínas e desestabilizar seus RNAs – alvo (BAEK, VILLEN *et al.*, 2008; SELBACH, SCHWANHAUSSER *et al.*, 2008). Previstos como reguladores de mais de um terço do genoma humano, os microRNAs são sabidamente essenciais para o desenvolvimento de células e organismos (LEE e AMBROS, 2001; LEWIS, BURGE *et al.*, 2005).

Em humanos, foram encontrados mais de 3000 genes de microRNAs (KOZOMARA e GRIFFITHS-JONES, 2011; FRIEDLANDER, LIZANO *et al.*, 2014). Estes genes podem ser transcritos pela RNA polimerase II ou III em transcritos primários chamados de microRNAs primários. Estes transcritos são clivados no núcleo pela enzima *Drosha* e seu cofator, *Pasha*, no meio da sua estrutura em forma de grampo (*stem loop*), originando o chamado pré - microRNA (~70 nucleotídeos). Os pré - microRNAs são exportados ao citoplasma e processados por outras enzimas, como a *Dicer*, para gerar um duplex de microRNA maduro (~22 nucleotídeos) que pode ser incorporado a um complexo silenciador induzido por RNA (RISC) para ser ativado como regulador pós – transcricional (revisão em KIM, 2005 e KIM, HAN *et al.*, 2009). Os microRNAs silenciam os transcritos por facilitarem a clivagem argonauta -

dependente de RNAs mensageiros (RNAm) e/ou por agirem como barreira física à tradução, dependendo do nível de complementaridade com seus alvos (Figura 3). A região 5' proximal do microRNA (região *seed*) hibridiza com a sequência na região 3'UTR do RNAm (GUO, INGOLIA *et al.*, 2010). Análises computacionais e experimentais revelaram que cada microRNA pode ter aproximadamente 400 RNAm – alvo e quase metade do transcriptoma mamífero é alvo de microRNAs (BARTEL, 2009).

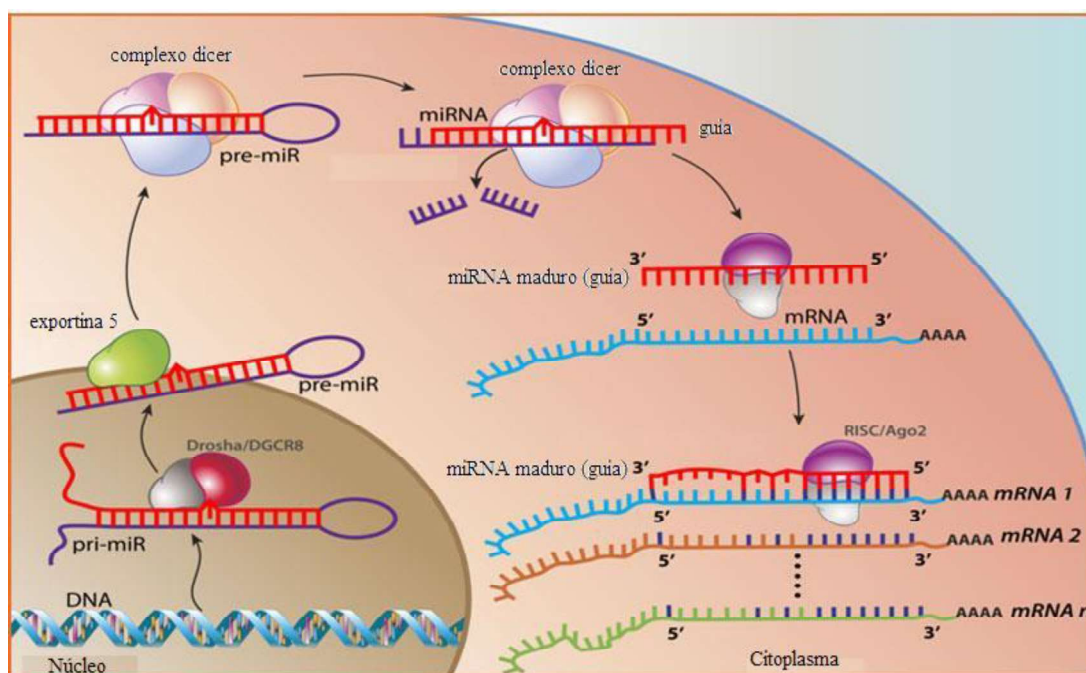


Figura 3. Biossíntese e atuação dos microRNAs (adaptado de <http://www.regulusrx.com/microrna/index.php>).

A desregulação de microRNAs vem sendo relacionada à obesidade humana (MARTINELLI, NARDELLI *et al.*, 2010; MCGREGOR e CHOI, 2011; GE, BRICHARD *et al.*, 2014). Além disso, uma série de evidências mostra que os microRNAs são indispensáveis para diferenciação terminal e função dos adipócitos. Um estudo (MUDHASANI, IMBALZANO *et al.*, 2010) revelou que os microRNAs são, de forma global, importantes para a adipogênese *in vitro*. Pré – adipócitos com ablação homocigótica da enzima *Dicer* apresentaram defeitos

na lipogênese e redução em várias vezes de marcadores adipocitários como PPAR γ , GLUT4 e FABP4. Outro estudo do mesmo grupo (MUDHASANI, PURI *et al.*, 2010) mostrou evidências genéticas para a importância fisiológica da regulação dos microRNAs no desenvolvimento de adipócitos *in vivo* em camundongos. Já Ortega e colaboradores (ORTEGA, MORENO-NAVARRETE *et al.*, 2010) analisaram o perfil das mudanças ocorridas na expressão de microRNAs durante a adipogênese. O estudo mostrou que 70 microRNAs (8,8%) apresentaram diferença estatisticamente significativa nos níveis de expressão entre os pré – adipócitos e adipócitos humanos, implicando uma importância dos microRNAs no desenvolvimento adipocitário.

Tecidos individuais mantêm um padrão único de expressão de microRNAs, o que sugere que estes pequenos RNAs contribuam de forma específica para o funcionamento do tecido através da regulação de diferentes genes-alvo (LIANG, RIDZON *et al.*, 2007; OLIVE, MINELLA *et al.*, 2015). Um estudo de pesquisadores alemães (KLOTING, BERTHOLD *et al.*, 2009) confirmou a hipótese de a expressão dos microRNAs no tecido adiposo humano ser específica dependendo da localização do depósito de tecido adiposo e a relacionou aos parâmetros morfológicos deste tecido, à obesidade e ao metabolismo da glicose. Além disso, o mesmo estudo sugeriu que os microRNAs apresentam papel importante na atratividade de células imunes ao tecido adiposo.

1.6.1. Critérios para seleção dos microRNAs

O tecido adiposo, além de funcionar como estoque lipídico, exerce importante papel na integração de sinais endócrinos, metabólicos e

inflamatórios (FANTUZZI, 2005). Foram escolhidos para o presente estudo microRNAs que tinham por alvo genes relacionados às características inflamatórias, angiogênicas e metabólicas do TAB, como descrito anteriormente sendo eles representantes das seguintes classes: reguladores e citocinas pró-inflamatórias (*P2RX7*, *TNFA*), proteínas associadas à regulação macrocitária (*PKNOX1*), adipocinas (*ADIPOQ*, *LEP*, *RETN*), fatores de transcrição (*PPARG*), proteínas envolvidas no metabolismo lipídico (*SIRT1*) e outras substâncias relacionadas à homeostase vascular (*VEGF*, *VEGFR*).

A identificação de microRNAs por experimentos tradicionais, como clonagem direta, perde pela baixa sensibilidade devido a baixos níveis e padrão de expressão (BARTEL, 2004; BEREZIKOV, CUPPEN *et al.*, 2006). Como alternativa, métodos de predição computacional dedicados à descoberta de novos genes de microRNAs através da análise do DNA genômico apresentam um papel crucial. O principal sinal utilizado nos métodos computacionais tem sido a estrutura secundária tipo *hairpin* dos precursores dos microRNAs (pré-microRNAs) (BARTEL, 2004; KIM e NAM, 2006; KANG e FRIEDLANDER, 2015).

Os microRNAs que tinham por alvo os genes de interesse escolhidos foram selecionados a partir de ferramentas de bioinformática disponíveis gratuitamente na internet, juntamente com a análise de dados prévios da literatura. Vários bancos de dados de microRNAs foram utilizados, a fim de enriquecer a busca e gerar informações fidedignas das relações RNAm – microRNA.

Um total de 11 microRNAs foram escolhidos com base na sua complementariedade com as regiões 3'UTR em genes alvo envolvidos nas vias metabólica, angiogênica e inflamatória do tecido adiposo. Esses microRNAs foram selecionados através da ferramenta TargetScanHuman (AGARWAL, BELL *et al.*, 2015) e confirmados pelas bases de dados online miRBase (GRIFFITHS-JONES, 2006) e miRò (LAGANA, FORTE *et al.*, 2009). De todos os microRNAs sugeridos para cada gene alvo na nossa busca, foram selecionados apenas aqueles que mostraram complementariedade perfeita nas posições de 2-8 da região *seed* do microRNA maduro.

Como discutido previamente, apesar de a obesidade ser caracterizada pelo aumento do estoque de ácidos graxos e crescimento da massa adipocitária, outras moléculas participam de forma importante na criação e manutenção do estado obeso. A fim de aprofundar os conhecimentos neste tema, a compreensão dos mecanismos moleculares que atuam controlando a expressão e os níveis séricos dessas proteínas é essencial. Logo, os polimorfismos e os microRNAs relacionados aos genes de interesse que participam dos processos metabólico, angiogênico e inflamatório do tecido adiposo são alvos-chave a serem explorados. Assim, com uma visão mais ampla do problema, soluções e tratamentos mais eficazes contra obesidade poderão ser discutidos, testados e, então, disponibilizados à população nos próximos anos.

2 Objetivos

2.1 Geral

Comparar o padrão de expressão de microRNAs que apresentam como alvo genes envolvidos tanto nos processos inflamatório e angiogênico quanto relacionados ao perfil metabólico em tecido adiposo subcutâneo de indivíduos obesos e não – obesos, além de investigar a associação de variações em genes de adipocinas com as alterações presentes na obesidade humana.

2.2 Específicos

1. Implantar as metodologias laboratoriais para a análise de microRNAs pela transcrição reversa e reação da polimerase em tempo real;
2. Verificar e comparar a expressão dos microRNAs de interesse (a saber, miR-16, -26b, -27a e b, -125b, -132, -186, -223, -424-3p e 5p, -519d) no tecido adiposo de indivíduos obesos e não - obesos;
3. Utilizar ferramentas de bioinformática para confirmar os genes alvo dos microRNAs;
4. Avaliar os níveis de adipocinas plasmáticas nos indivíduos estudados;
5. Acompanhar a evolução de parâmetros metabólicos e bioquímicos nos indivíduos obesos que foram submetidos à cirurgia bariátrica;
6. Genotipar variações em regiões promotoras de genes de adipocinas (a saber, *LEP* -2548 G>A, *RETN* -420 C>G, *ADIPOQ* -11391 G>A e *ADIPOQ* -11377 C>G) e compará-las aos os níveis plasmáticos das variáveis avaliadas e com alterações metabólicas.

3 Referências citadas na introdução

- ABBATECOLA, A. M., L. FERRUCCI, *et al.* Diverse effect of inflammatory markers on insulin resistance and insulin-resistance syndrome in the elderly. J Am Geriatr Soc, v.52, n.3, Mar, p.399-404. 2004.
- ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. acessado em dezembro de 2015. <http://www.abeso.org.br/>.
- AGARWAL, V., G. W. BELL, *et al.* Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. Elife, v.4. 2015.
- AHIMA, R. S. Metabolic actions of adipocyte hormones: focus on adiponectin. Obesity (Silver Spring), v.14 Suppl 1, Feb, p.9S-15S. 2006.
- ALEXANDER, R., H. LODISH, *et al.* MicroRNAs in adipogenesis and as therapeutic targets for obesity. Expert Opin Ther Targets, Feb 28. 2011.
- ALLENDER, S. e M. RAYNER. The burden of overweight and obesity-related ill health in the UK. Obes Rev, v.8, n.5, Sep, p.467-73. 2007.
- BAEK, D., J. VILLEN, *et al.* The impact of microRNAs on protein output. Nature, v.455, n.7209, Sep 4, p.64-71. 2008.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, v.116, n.2, Jan 23, p.281-97. 2004.
- _____. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell, v.136, n.2, Jan 23, p.215-33. 2009.
- BECKERS, S., A. V. PEETERS, *et al.* Analysis of genetic variations in the resistin gene shows no associations with obesity in women. Obesity (Silver Spring), v.16, n.4, Apr, p.905-7. 2008.
- BECKERS, S., D. ZEGERS, *et al.* Resistin polymorphisms show associations with obesity, but not with bone parameters in men: results from the Odense Androgen Study. Mol Biol Rep, v.40, n.3, Mar, p.2467-72. 2013.
- BENGMARK, S. Obesity, the deadly quartet and the contribution of the neglected daily organ rest - a new dimension of un-health and its prevention. Hepatobiliary Surg Nutr, v.4, n.4, Aug, p.278-88. 2015.
- BEREZIKOV, E., E. CUPPEN, *et al.* Approaches to microRNA discovery. Nat Genet, v.38 Suppl, Jun, p.S2-7. 2006.
- BLUHER, M. Adipokines - removing road blocks to obesity and diabetes therapy. Mol Metab, v.3, n.3, Jun, p.230-40. 2014.

CAMPFIELD, L. A., F. J. SMITH, *et al.* The OB protein (leptin) pathway--a link between adipose tissue mass and central neural networks. Horm Metab Res, v.28, n.12, Dec, p.619-32. 1996.

CAO, R., E. BRAKENHIELM, *et al.* Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.11, May 22, p.6390-5. 2001.

CAO, Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. J Clin Invest, v.117, n.9, Sep, p.2362-8. 2007.

_____. Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. Nat Rev Drug Discov, v.9, n.2, Feb, p.107-15. 2010.

CARMELIET, P., V. FERREIRA, *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature, v.380, n.6573, Apr 4, p.435-9. 1996.

CASTILHOS, J. K., E. SPRINZ, *et al.* Polymorphisms in adiponectin receptor genes are associated with lipodystrophy-related phenotypes in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. HIV Med, v.16, n.8, Sep, p.494-501. 2015.

CAWTHORN, W. P., F. HEYD, *et al.* Tumour necrosis factor-alpha inhibits adipogenesis via a beta-catenin/TCF4(TCF7L2)-dependent pathway. Cell Death Differ, v.14, n.7, Jul, p.1361-73. 2007.

CAWTHORN, W. P. e J. K. SETHI. TNF-alpha and adipocyte biology. FEBS Lett, v.582, n.1, Jan 9, p.117-31. 2008.

CDC. Center for Disease Control. acessado em dezembro de 2015.

CHEN, L., R. CHEN, *et al.* Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. Int J Endocrinol, v.2015, p.508409. 2015.

CHRISTIAENS, V. e H. R. LIJNEN. Angiogenesis and development of adipose tissue. Mol Cell Endocrinol, v.318, n.1-2, Apr 29, p.2-9. 2010.

CILDIR, G., S. C. AKINCILAR, *et al.* Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. Trends Mol Med, v.19, n.8, Aug, p.487-500. 2013.

CONSIDINE, R. V., M. K. SINHA, *et al.* Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. N Engl J Med, v.334, n.5, Feb 1, p.292-5. 1996.

CURAT, C. A., A. MIRANVILLE, *et al.* From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. Diabetes, v.53, n.5, May, p.1285-92. 2004.

DASGUPTA, S., M. SALMAN, *et al.* Genetic variants in leptin: Determinants of obesity and leptin levels in South Indian population. Adipocyte, v.4, n.2, Apr-Jun, p.135-40. 2015.

- DJEBALI, S., C. A. DAVIS, *et al.* Landscape of transcription in human cells. Nature, v.489, n.7414, Sep 6, p.101-8. 2012.
- DOUGKAS, A., P. YAQOOB, *et al.* The impact of obesity-related SNP on appetite and energy intake. Br J Nutr, v.110, n.6, Sep 28, p.1151-6. 2013.
- ELMQUIST, J. K., C. F. ELIAS, *et al.* From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. Neuron, v.22, n.2, Feb, p.221-32. 1999.
- FAIN, J. N., A. K. MADAN, *et al.* Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. Endocrinology, v.145, n.5, May, p.2273-82. 2004.
- FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. J Allergy Clin Immunol, v.115, n.5, May, p.911-9; quiz 920. 2005.
- FERREIRA, V. e R. MAGALHÃES. Obesidade no Brasil: tendências atuais. Revista Portuguesa de Saúde Pública, v.24, n.2, p.71-81. 2006.
- FONSECA-ALANIZ, M. H., J. TAKADA, *et al.* Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. J Pediatr (Rio J), v.83, n.5 Suppl, Nov, p.S192-203. 2007.
- FRIEDLANDER, M. R., E. LIZANO, *et al.* Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. Genome Biol, v.15, n.4, p.R57. 2014.
- FRUHBECK, G., J. GOMEZ-AMBROSI, *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, Jun, p.E827-47. 2001.
- GE, Q., S. BRICHARD, *et al.* microRNAs as a new mechanism regulating adipose tissue inflammation in obesity and as a novel therapeutic strategy in the metabolic syndrome. J Immunol Res, v.2014, p.987285. 2014.
- GERSTEIN, M. B., A. KUNDAJE, *et al.* Architecture of the human regulatory network derived from ENCODE data. Nature, v.489, n.7414, Sep 6, p.91-100. 2012.
- GLAS, R., N. S. SAUTER, *et al.* Purinergic P2X7 receptors regulate secretion of interleukin-1 receptor antagonist and beta cell function and survival. Diabetologia, v.52, n.8, Aug, p.1579-88. 2009.
- GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: the microRNA sequence database. Methods Mol Biol, v.342, p.129-38. 2006.
- GUO, H., N. T. INGOLIA, *et al.* Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. Nature, v.466, n.7308, Aug 12, p.835-40. 2010.
- HARMS, M. e P. SEALE. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. Nat Med, v.19, n.10, Oct, p.1252-63. 2013.

- HAUSMAN, G. J. e R. G. KAUFFMAN. The histology of developing porcine adipose tissue. J Anim Sci, v.63, n.2, Aug, p.642-58. 1986.
- HOLMES, K., O. L. ROBERTS, *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. Cell Signal, v.19, n.10, Oct, p.2003-12. 2007.
- ITO, A., T. SUGANAMI, *et al.* Role of CC chemokine receptor 2 in bone marrow cells in the recruitment of macrophages into obese adipose tissue. J Biol Chem, v.283, n.51, Dec 19, p.35715-23. 2008.
- KAMEI, N., K. TOBE, *et al.* Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. J Biol Chem, v.281, n.36, Sep 8, p.26602-14. 2006.
- KANDA, H., S. TATEYA, *et al.* MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. J Clin Invest, v.116, n.6, Jun, p.1494-505. 2006.
- KANG, W. e M. R. FRIEDLANDER. Computational Prediction of miRNA Genes from Small RNA Sequencing Data. Front Bioeng Biotechnol, v.3, p.7. 2015.
- KAWAGUCHI, N., K. TORIYAMA, *et al.* De novo adipogenesis in mice at the site of injection of basement membrane and basic fibroblast growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A, v.95, n.3, Feb 3, p.1062-6. 1998.
- KERSHAW, E. E. e J. S. FLIER. Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab, v.89, n.6, Jun, p.2548-56. 2004.
- KIM, S. H. e J. PLUTZKY. Brown Fat and Browning for the Treatment of Obesity and Related Metabolic Disorders. Diabetes Metab J, v.40, n.1, Feb, p.12-21. 2016.
- KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nat Rev Mol Cell Biol, v.6, n.5, May, p.376-85. 2005.
- KIM, V. N., J. HAN, *et al.* Biogenesis of small RNAs in animals. Nat Rev Mol Cell Biol, v.10, n.2, Feb, p.126-39. 2009.
- KIM, V. N. e J. W. NAM. Genomics of microRNA. Trends Genet, v.22, n.3, Mar, p.165-73. 2006.
- KLOTING, N., S. BERTHOLD, *et al.* MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. PLoS One, v.4, n.3, p.e4699. 2009.
- KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. Nature, v.404, n.6778, Apr 6, p.635-43. 2000.
- KOZOMARA, A. e S. GRIFFITHS-JONES. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. Nucleic Acids Res, v.39, n.Database issue, Jan, p.D152-7. 2011.

- KRIEGLER, M., C. PEREZ, *et al.* A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. Cell, v.53, n.1, Apr 8, p.45-53. 1988.
- KRZYSZTOSZEK, J., E. WIERZEJSKA, *et al.* Obesity. An analysis of epidemiological and prognostic research. Arch Med Sci, v.11, n.1, Mar 16, p.24-33. 2015.
- LAGANA, A., S. FORTE, *et al.* miRo: a miRNA knowledge base. Database (Oxford), v.2009, p.bap008. 2009.
- LANDSKRONER-EIGER, S., B. QIAN, *et al.* Proangiogenic contribution of adiponectin toward mammary tumor growth in vivo. Clin Cancer Res, v.15, n.10, May 15, p.3265-76. 2009.
- LEAL VDE, O. e D. MAFRA. Adipokines in obesity. Clin Chim Acta, v.419, Apr 18, p.87-94. 2013.
- LEDOUX, S., I. QUEGUINER, *et al.* Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. Diabetes, v.57, n.12, Dec, p.3247-57. 2008.
- LEE, R. C. e V. AMBROS. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. Science, v.294, n.5543, Oct 26, p.862-4. 2001.
- LEWIS, B. P., C. B. BURGE, *et al.* Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell, v.120, n.1, Jan 14, p.15-20. 2005.
- LIANG, Y., D. RIDZON, *et al.* Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. BMC Genomics, v.8, p.166. 2007.
- LIJNEN, H. R. Angiogenesis and obesity. Cardiovasc Res, v.78, n.2, May 1, p.286-93. 2008.
- LODISH, H. F., B. ZHOU, *et al.* Micromanagement of the immune system by microRNAs. Nat Rev Immunol, v.8, n.2, Feb, p.120-30. 2008.
- LU, J. F., Y. ZHOU, *et al.* Association of ADIPOQ polymorphisms with obesity risk: a meta-analysis. Hum Immunol, v.75, n.10, Oct, p.1062-8. 2014.
- MARTINELLI, R., C. NARDELLI, *et al.* miR-519d overexpression is associated with human obesity. Obesity (Silver Spring), v.18, n.11, Nov, p.2170-6. 2010.
- MATTEVI, V. S., V. M. ZEMBRZUSKI, *et al.* A resistin gene polymorphism is associated with body mass index in women. Hum Genet, v.115, n.3, Aug, p.208-12. 2004.

- MCCARTNEY-FRANCIS, N. L. e S. M. WAHL. Transforming growth factor beta: a matter of life and death. J Leukoc Biol, v.55, n.3, Mar, p.401-9. 1994.
- MCGREGOR, R. A. e M. S. CHOI. microRNAs in the Regulation of Adipogenesis and Obesity. Curr Mol Med, Apr 21. 2011.
- MEIER, C. A., E. BOBBIONI, *et al.* IL-1 receptor antagonist serum levels are increased in human obesity: a possible link to the resistance to leptin? J Clin Endocrinol Metab, v.87, n.3, Mar, p.1184-8. 2002.
- MORTON, G. J., D. E. CUMMINGS, *et al.* Central nervous system control of food intake and body weight. Nature, v.443, n.7109, Sep 21, p.289-95. 2006.
- MUDHASANI, R., A. N. IMBALZANO, *et al.* An essential role for Dicer in adipocyte differentiation. J Cell Biochem, v.110, n.4, Jul 1, p.812-6. 2010.
- MUDHASANI, R., V. PURI, *et al.* Dicer is required for the formation of white but not brown adipose tissue. J Cell Physiol. published online 13 October 2010, doi: 10.1002/jcp.22475
2010.
- NARCISSE, L., E. SCEMES, *et al.* The cytokine IL-1beta transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes. Glia, v.49, n.2, Jan 15, p.245-58. 2005.
- NCEP. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. Circulation, v.106, n.25, Dec 17, p.3143-421. 2002.
- NISHIMURA, S., I. MANABE, *et al.* Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. Diabetes, v.56, n.6, Jun, p.1517-26. 2007.
- OGDEN, C. L., M. D. CARROLL, *et al.* Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. JAMA, v.311, n.8, Feb 26, p.806-14. 2014.
- OHMAN, M. K., Y. SHEN, *et al.* Visceral adipose tissue inflammation accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Circulation, v.117, n.6, Feb 12, p.798-805. 2008.
- OKAMURA, K., Y. SATO, *et al.* Endogenous basic fibroblast growth factor-dependent induction of collagenase and interleukin-6 in tumor necrosis factor-treated human microvascular endothelial cells. J Biol Chem, v.266, n.29, Oct 15, p.19162-5. 1991.
- OLIVE, V., A. C. MINELLA, *et al.* Outside the coding genome, mammalian microRNAs confer structural and functional complexity. Sci Signal, v.8, n.368, Mar 17, p.re2. 2015.

- ORTEGA, F. J., J. M. MORENO-NAVARRETE, *et al.* MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. PLoS One, v.5, n.2, p.e9022. 2010.
- PANG, C., Z. GAO, *et al.* Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.295, n.2, Aug, p.E313-22. 2008.
- PARK, B. Y., H. LEE, *et al.* Reduction of Adipose Tissue Mass by the Angiogenesis Inhibitor ALS-L1023 from *Melissa officinalis*. PLoS One, v.10, n.11, p.e0141612. 2015.
- PICARD, F., M. KURTEV, *et al.* Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. Nature, v.429, n.6993, Jun 17, p.771-6. 2004.
- PRENTICE, A. M. The emerging epidemic of obesity in developing countries. Int J Epidemiol, v.35, n.1, Feb, p.93-9. 2006.
- PRESTA, M., P. DELL'ERA, *et al.* Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. Cytokine Growth Factor Rev, v.16, n.2, Apr, p.159-78. 2005.
- PROENCA, A. R., R. A. SERTIE, *et al.* New concepts in white adipose tissue physiology. Braz J Med Biol Res, v.47, n.3, Feb, p.192-205. 2014.
- RAHMAN, S. e R. ISLAM. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. Cell Commun Signal, v.9, p.11. 2011.
- RAJALA, M. W. e P. E. SCHERER. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. Endocrinology, v.144, n.9, Sep, p.3765-73. 2003.
- ROTH, J., X. QIANG, *et al.* The obesity pandemic: where have we been and where are we going? Obes Res, v.12 Suppl 2, Nov, p.88S-101S. 2004.
- RUAN, H., N. HACOHEN, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. Diabetes, v.51, n.5, May, p.1319-36. 2002.
- RUOTSALAINEN, E., U. SALMENNIEMI, *et al.* Changes in inflammatory cytokines are related to impaired glucose tolerance in offspring of type 2 diabetic subjects. Diabetes Care, v.29, n.12, Dec, p.2714-20. 2006.
- SABIO, G. e R. J. DAVIS. cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): roles in metabolic regulation of insulin resistance. Trends Biochem Sci, v.35, n.9, Sep, p.490-6. 2010.
- SALMENNIEMI, U., E. RUOTSALAINEN, *et al.* Multiple abnormalities in glucose and energy metabolism and coordinated changes in levels of adiponectin, cytokines, and

adhesion molecules in subjects with metabolic syndrome. Circulation, v.110, n.25, Dec 21, p.3842-8. 2004.

SAMAD, F., K. YAMAMOTO, *et al.* Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice. Mol Med, v.3, n.1, Jan, p.37-48. 1997.

SCHEJA, L. e J. HEEREN. Metabolic interplay between white, beige, brown adipocytes and the liver. J Hepatol, Jan 29. 2016.

SCHWARTZ, D. R. e M. A. LAZAR. Human resistin: found in translation from mouse to man. Trends Endocrinol Metab, v.22, n.7, Jul, p.259-65. 2011.

SELBACH, M., B. SCHWANHAUSSER, *et al.* Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. Nature, v.455, n.7209, Sep 4, p.58-63. 2008.

SHOELSON, S. E., J. LEE, *et al.* Inflammation and insulin resistance. J Clin Invest, v.116, n.7, Jul, p.1793-801. 2006.

SINDHU, S., R. THOMAS, *et al.* Obesity Is a Positive Modulator of IL-6R and IL-6 Expression in the Subcutaneous Adipose Tissue: Significance for Metabolic Inflammation. PLoS One, v.10, n.7, p.e0133494. 2015.

SKURK, T., C. ALBERTI-HUBER, *et al.* Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. J Clin Endocrinol Metab, v.92, n.3, Mar, p.1023-33. 2007.

SPERETTA, G. F., R. D. LEITE, *et al.* Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. HUPE v.13, n.1, Jan/Mar, p.61-69. 2014.

SUGANAMI, T., J. NISHIDA, *et al.* A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.25, n.10, Oct, p.2062-8. 2005.

SUGANAMI, T. e Y. OGAWA. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. J Leukoc Biol, v.88, n.1, Jul, p.33-9. 2010.

SUGANAMI, T., K. TANIMOTO-KOYAMA, *et al.* Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.27, n.1, Jan, p.84-91. 2007.

TRAN, C. M., S. MUKHERJEE, *et al.* Rapamycin blocks induction of the thermogenic program in white adipose tissue. Diabetes, Feb 8. 2016.

TRAYHURN, P. e J. H. BEATTIE. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. Proc Nutr Soc, v.60, n.3, Aug, p.329-39. 2001.

TRAYHURN, P., C. BING, *et al.* Adipose tissue and adipokines--energy regulation from the human perspective. J Nutr, v.136, n.7 Suppl, Jul, p.1935S-1939S. 2006.

TRINCA, J. R., E. SPRINZ, *et al.* SNPs in the APM1 gene promoter are associated with adiponectin levels in HIV-infected individuals receiving HAART. J Acquir Immune Defic Syndr, v.55, n.3, Nov, p.299-305. 2010.

TSENG, Y. H., A. M. CYPESS, *et al.* Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. Nat Rev Drug Discov, v.9, n.6, Jun, p.465-82. 2010.

UCHIDA, Y., K. TAKESHITA, *et al.* Stress augments insulin resistance and prothrombotic state: role of visceral adipose-derived monocyte chemoattractant protein-1. Diabetes, v.61, n.6, Jun, p.1552-61. 2012.

WEISBERG, S. P., D. HUNTER, *et al.* CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. J Clin Invest, v.116, n.1, Jan, p.115-24. 2006.

WEISBERG, S. P., D. MCCANN, *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest, v.112, n.12, Dec, p.1796-808. 2003.

WHO. World Health Organization acessada em janeiro de 2016.
<http://www.who.int/en/>.

WOOD, I. S. e P. TRAYHURN. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. Br J Nutr, v.89, n.1, Jan, p.3-9. 2003.

XU, H., G. T. BARNES, *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest, v.112, n.12, Dec, p.1821-30. 2003.

XU, L., H. KITADE, *et al.* Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Obesity-Associated Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Biomolecules, v.5, n.3, p.1563-79. 2015.

ZAMANI, N. e C. W. BROWN. Emerging roles for the transforming growth factor- β superfamily in regulating adiposity and energy expenditure. Endocr Rev, v.32, n.3, Jun, p.387-403. 2011.

ZANDONA, M. R., R. O. RODRIGUES, *et al.* Polymorphisms in LEPR, PPARG and APM1 genes: associations with energy intake and metabolic traits in young children. Arq Bras Endocrinol Metabol, v.57, n.8, Nov, p.603-11. 2013.

ZHANG, Q. X., C. J. MAGOVERN, *et al.* Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. J Surg Res, v.67, n.2, Feb 1, p.147-54. 1997.

ZHUANG, G., C. MENG, *et al.* A novel regulator of macrophage activation: miR-223 in obesity-associated adipose tissue inflammation. Circulation, v.125, n.23, Jun 12, p.2892-903. 2012.

Artigo 1

Submetido ao periódico *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*

Fator de impacto: 3,553

Title: Differential expression of miRNAs related to angiogenesis and adipogenesis in subcutaneous fat of obese and non-obese women

Small title: miRNAs in subcutaneous fat

Aline S. Gasparotto^a; Diego O. Borges^a; Marina G. M. Sassi^a; Adriana Milani^b; Darwin L. Rech^b; Marcia Terres^b; Pedro B. Ely^b; Mauricio J. Ramos^c; Nelson G. Mehnardt^c; Vanessa S. Mattevi^a

^a Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmento Leite, 245 - Centro Histórico, Porto Alegre – RS, 90050-170 RS, Brazil;

^b Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Rua Professor Annes Dias, 295 - Centro Histórico, Porto Alegre - RS, 90020-090, Brazil;

^c Hospital Nossa Senhora da Conceição, Avenida Francisco Trein, 596 - Cristo Redentor, Porto Alegre – RS, 91350-200, Brazil.

Corresponding author: Vanessa Suñé Mattevi, PhD.
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Rua Sarmento Leite, 245, sala 309
CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil
Phone: +55-51-33038763, Fax: +55-51-33038718
E-mail: vmattevi@ufcspa.edu.br

Sponsors and grant number: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – 471437/2012-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) processo nº 12/2226-9 and 1153-2551/13-9.

Abstract

Background: To disclose the mechanisms surrounding obesity, we selected microRNAs that target genes involved in angiogenesis, inflammation and adipogenesis and compared their expression in subcutaneous adipose tissue (SAT) of 21 obese and 19 non-obese women.

Methods: Subcutaneous adipose tissue samples were collected during surgery and mature microRNAs were quantified by real-time PCR.

Results: miR-16 was overexpressed in the non-obese group (n-expression ratio= -151.1; $P < 0.001$). Additionally, the expression of miR-27b and miR-424-5p was significantly correlated with waist circumference in non-obese women (BMI, $r = 0.453$; $P = 0.027$ and $r = 0.502$, $P = 0.014$, respectively). Total and central subcutaneous adipose tissue were correlated with miR-424-5p levels ($r = 0.475$, $P = 0.046$ and $r = 0.506$, $P = 0.034$, respectively). miR-424-5p expression was also correlated with BMI in the obese group ($r = 0.582$, $P = 0.018$).

Conclusions: Both miR-16 and miR-424 have vascular endothelial growth factor (*VEGF*) and its receptors as target genes, suggesting they may be involved in the alterations of angiogenesis observed in obesity. These results highlight the importance of miRNA expression in subcutaneous adipose tissue and put them on focus to be used in the future as prognostic markers.

Abbreviations: subcutaneous adipose tissue (SAT)

Keywords: Adipose tissue; obesity; microRNA; miR-16; miR-424; miR-27

Introduction

Obesity and its related comorbidities, such as type II diabetes, cardiovascular diseases, and certain types of cancer, have been threatening health of a growing number of people worldwide [1]. In order to fight this global epidemic, the study of adipose tissue biology has become increasingly important in the last years.

Evidence has accumulated indicating obesity is associated with a state of adipose tissue remodeling, characterized by adipocyte hypertrophy, increased angiogenesis and production of proinflammatory adipokines during the progression of chronic inflammation [2] [3]. Unbalanced production of regulatory molecules by adipocytes, macrophages and endothelial cells may play a major role in this pathology.

Since a new layer of post-transcriptional control of gene expression has been discovered, performed by microRNAs (miRNAs), it has been related to most biological processes [4]. The importance of miRNAs is well recognized in regulating genetic networks and subsequent physiological processes. Altered expression levels of miRNAs in human and animal models have been associated with various diseases conditions and their progression, including obesity-associated comorbidities [5] [6] [7]. miRNAs can suppress the production of target proteins by inducing their messenger RNA (mRNA) degradation and/or blocking their translation [8], through binding to the 3' untranslated region of mRNAs.

Although it is widely accepted that obesity is a heritable condition, even the most powerful genome-wide association studies (GWAS) recently published [9] have, so far, explained only 2.7% of the variation in body mass index in the general population. Furthermore, Shungin *et al.* [10] conducted a genome-wide association meta-analysis of traits related to waist and hip circumferences in up to 224,459 individuals, finding that the pathway analyses implicated adipogenesis, angiogenesis, transcriptional regulation and insulin resistance as processes affecting fat distribution. Thus, the explanation of this so-called “missing heritability” in adiposity may rely on the still less explored level of gene regulation, at the miRNAs expression. Furthermore, several miRNAs and their targets have been implicated in the linkage between inflammation, angiogenesis and obesity [7] [11] [12] in the years since their discovery.

Considering these evidences, we hypothesized and aimed to disclosure if specific miRNAs targeting genes involved in angiogenesis, inflammation, and adipogenesis may be differentially expressed in adipose tissue from obese and non-

obese individuals. We believe this strategy can improve the understanding of molecular mechanisms underlying the accumulation of fat mass in the human body. Aggregating to this, microRNAs could be used as prognostic markers and/or synergistically with other treatments to mitigate obesity and associated diseases.

Materials and methods

Study population

This cross-sectional study included 40 patients, all women, consecutively recruited from reference centers in two hospitals in Porto Alegre, southern Brazil. The obese group (body mass index, $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$) was constituted by 20 patients who underwent bariatric surgery for weight management and one who was submitted to cosmetic surgery (totaling 21 individuals). On the other hand, the non-obese group ($BMI < 30 \text{ kg/m}^2$) consisted of 19 patients who underwent abdominoplasty for cosmetic purposes.

The inclusion criteria for the study were patients older than 18 years of age and who had confirmed BMI according to the group to which they belonged at the moment of enrollment. The exclusion criteria were pregnancy and chronic inflammatory disease.

Procedures

An interview was performed at enrollment to obtain demographic and lifestyle information. The patients' ethnicities were self-defined and classified as white or non-white (black and brown). Subcutaneous adipose tissue and plasma samples were obtained from all patients during surgery.

Anthropometric analysis

At the moment of inclusion in the study, for non-obese patients, a complete physical examination was performed by the same researcher and included measurements of weight (kilograms), height (meters), waist circumference (centimeters) and seven skinfold thicknesses (millimeters), performed in triplicate at the right side of the body with a Lange skinfold caliper (Beta Technology, California, USA). Biceps, triceps and calf folds were grouped into a single measurement named limbs subcutaneous fat (LSF). Subscapular, axillary, suprailiac and abdominal folds were grouped into a single measurement called central subcutaneous fat (CSF). Total

subcutaneous fat (TSF) was calculated as the total sum of LSF and CSF. BMI was calculated using the following formula: $BMI = \text{weight in kilograms} / (\text{height in meters})^2$. All data were stored in a database using the Microsoft Excel program (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). For obese patients only BMI was assessed, because literature data suggest imprecision of waist circumference and skinfold thickness in extremely obese patients and no additional clinically distinguishing or relevant information will likely be obtained by performing anthropometric assessments other than BMI in these individuals [13] [14].

microRNA selection

A total of 11 miRNAs were chosen based on their complementarity to 3'UTR regions on target genes involved in metabolic, angiogenic and inflammatory adipose pathways (Table 1). miRNAs that target our genes of interest were selected through the TargetScanHuman [15] and confirmed by miRBase [16], and miRò online databases [17]. From all miRNAs listed by the database for each gene of interest, we have selected only those which showed an exact match to positions 2-8 of the mature miRNA.

microRNA collection and analysis

Subcutaneous adipose tissue samples were collected from the region near stomach by the surgeon during the procedure and immediately stored in 1mL of Allprotect tissue reagent[®] (Qiagen, Hilden, Germany) at -20°C. Approximately 100µg of tissue were ground in 1 mL of the homogenization buffer from mirVana miRNA Isolation Kit[®] (Life Technologies, California, USA) using a Turrax tissue homogenizer (Marconi, São Paulo, Brazil). Homogenate was then subjected to the mirVana miRNA Isolation Kit[®] protocol for total RNA isolation according to manufacturers' instruction and stored at -80°C. RNA integrity and quantification were measured with BioSpec-nano (Shimadzu[®], Kyoto, Japan).

microRNAs were enriched to a final concentration of 1.2 ng/µL of total RNA eluted through a multiplex approach by using a pool of individual stem-loop primers of selected microRNA assays (Life Technologies[®], California, USA). Subsequently, the TaqMan[®] microRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies[®], California, USA) was used with a pre-amplification step. All cDNAs were stored at freezer temperature for no longer than five days. Afterwards, pre-amplified mature microRNAs from each sample were used in duplicate for relative quantification in a StepOnePlus[™] real-time

PCR System (Life Technologies[®], California, USA), using hydrolysis probes for detection and following MIQE guidelines [18]. Samples of both groups were included in each batch, in order to avoid any measurement bias.

An automatic baseline combined with a global threshold of 0.09 was used throughout the analysis. miRNA expression was measured using threshold cycle (C_T). Target miRNA C_T values were normalized to miR-let-7d and miR-126 endogenous controls, which have presented the lowest variation among all assays evaluated with ExpressionSuite Software version 1.0.3 (Life Technologies[®], California, USA). RNU48 had also been tested as an endogenous control, however it presented a higher level of variation than the aforementioned miRNAs.

Plasma adipokines

Human leptin, resistin and adiponectin were profiled in EDTA plasma samples with ELISA kits (EMD Millipore[®], Darmstadt, Germany). The assays were performed according to the manufacturer's instructions and the absorbances were read in a Bio-rad[®] (California, USA) microplate absorbance reader.

Ethical considerations

All participants were informed about the purposes of the study and signed a free and informed consent form. This study was approved by the Research Ethics Committee in each participating center (protocol numbers 481/11 and 11-115).

Statistical analyses

Using the Winpepi software [19], set to 95% of reliability and 90% of power, we have estimated that a sample of at least 38 subjects would be necessary in order to detect a difference in miRNA levels of 10% between groups.

Demographic and clinical continuous variables were compared between the two groups (obese and non-obese) using Student's t-test for independent samples. Categorical variables were contrasted with the chi-squared test with Yates continuity correction or Fisher's exact test. Asymmetrically distributed data (BMI, adiponectin and resistin levels) were transformed into their natural logarithm and then used for statistical analyses.

In order to normalize miRNA data to the internal controls and calculate the expression ratio between groups, the $2^{-\Delta Ct}$ approach [20] was used. Nonparametric groupwise Mann–Whitney-U and Student’s t-test for independent samples were used to compare miRNA expression between obese and non-obese patients. Also, plasma adipokine levels and BMI were correlated with expression levels of individual miRNAs by using Pearson’s or Spearman’s statistics. All data were analyzed using the SPSS 17.0 program (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). All tests were two sided, and the level of significance was predefined at less than 0.05.

Results

All patients were female and their mean age was 42.0 ± 11.3 years. The main characteristics of the total sample stratified by BMI (non-obese and obese) are presented in Table 2. Most of subjects (95%) were non-smokers. Non-obese individuals engaged in physical activity more frequently than obese patients (Table 2, $P=0.011$).

All three adipokines plasma levels (leptin, adiponectin, and resistin) were compared between obese and non-obese individuals and are also shown in Table 2. Plasma levels of leptin ($P<0.001$) and adiponectin ($P=0.039$) were higher and lower in obese subjects, respectively. In contrast, resistin plasma levels were not different between groups. In the non-obese group, leptin plasma levels were significantly correlated with waist circumference ($r=0.496$, $P=0.036$). However, adiponectin and resistin levels were not correlated with this measure ($r=0.240$, $P=0.924$ and $r=0.295$, $P=0.235$, respectively).

The differential expression for each miRNA in the two groups analyzed is shown in Table 3. The most striking difference observed was in miR-16, that presented an expression about 150 times higher in the subcutaneous adipose tissue of non-obese than in the obese group (n-expression ratio= 151.121; $P<0.001$), which is depicted in Figure 1. A non-obese outlier individual was excluded of this analysis for showing a $2^{-\Delta Ct}$ value for miR-16 higher than 109.00. No significant differences were observed for the other miRNAs investigated between obese and non-obese women.

We next evaluated the correlation of the studied miRNAs expression with measurements of central and subcutaneous adiposity available for the non-obese women, i.e., waist circumference, total subcutaneous fat and central subcutaneous fat. Significant results are presented in Figure 2. Expression of miR-27b was correlated with waist circumference ($r=0.576$ $P=0.016$). When adjusted by BMI, this correlation

remained significant ($r=0.453$; $P=0.027$). miR-424-5p was also significantly correlated with waist circumference ($r=0.562$, $P=0.019$), even when adjusted by BMI (0.502 , $P=0.014$). In addition, miR-424-5p levels were correlated with both TSF and CSF ($r=0.512$, $P=0.036$ and $r=0.538$, $P=0.026$, respectively), even when adjusted by BMI ($r=0.475$, $P=0.046$ and $r=0.506$, $P=0.034$, respectively). Furthermore, miR-424-3p was correlated with BMI values in the obese group ($r=0.582$, $P=0.018$).

Discussion

Metabolic activity of adipose tissue has become a major focus of research due to the worldwide pandemic of obesity. In the present study, we compared the expression of selected miRNAs in subcutaneous fat between a group of obese and non-obese women, to identify changes in the levels of miRNAs that target genes involved in angiogenesis, adipogenesis and inflammation between these two groups.

In our sample, miR-16 was significantly overexpressed in subcutaneous adipose tissue of non-obese than in obese women. It is well known elevated levels of a miRNA reduce the translation of its target mRNAs [8]. A previous study [21] has computationally and experimentally predicted the vascular endothelial growth factor (*VEGF*) gene as one of the miR-16 targets, which was also shown in our online databases research (Table 1). Chamorro-Jorganes *et al.* [22] have demonstrated that miR-16 and miR-424 participate in regulation of VEGF receptor-2 (*VEGFR2*), fibroblast growth factor-1 (*FGFR1*) and *VEGF* genes in vascular endothelial cells in mice. Furthermore, they have shown miR-16 reduces blood vessel formation *in vivo*. In a review by Holmes *et al.*, [23] *VEGF* and *VEGFR2* genes have been related to proliferation, migration, survival and permeability of endothelial cells. Accordingly to this rationale, an overexpression of miR-16 in subcutaneous fat of non-obese individuals would keep a low expression of the above mentioned proangiogenic target genes, creating an unfavorable environment for cell proliferation. As a result, adipogenesis would be impaired in this scenario due to the lack of new vessels formation. Moreover, miR-16 has already been described as a suppressor of cell cycle progression by targeting innumerable G1 cyclins [24]. The importance of *VEGF* gene has also been highlighted in a recent GWAS [10], which considered it as one of the components of a gene set with biological effect in body fat regulation. In a recent review by Elias *et al.* [25] about the *VEGF-A* actions in the control of obesity and insulin resistance in the adipose tissue, these authors point out the

conflicting reports regarding the local and systemic levels of *VEGF* during obesity. There are evidence showing that *VEGF-A* concentration in serum correlates significantly with BMI, with higher *VEGF-A* levels observed in overweight and obese subjects and animal models. However, other authors have failed to reproduce these results and some studies have reported decreased *VEGF-A* expression in adipose tissue of obese mice and obese humans.

In the opposite direction of our results, Ortega *et al.* [26] have found elevated levels of miR-16 during adipocyte differentiation in white adipose tissue, suggesting a role in the biogenesis of this tissue. However, many miRNAs have been shown to be upregulated in obesity and downregulated in adipogenesis, or *vice-versa* [27] [26]. MiR-16 has already been described as endogenous control in previous studies [28] [29]. On the other hand, a comprehensive search for miRNAs to be used as endogenous controls in human adipose tissue performed by Neville *et al.* [30] did not include miR-16 among the 13 most stable miRNAs found in human adipose tissue.

Despite the fact that both miR-16 and miR-424 share the same seed region, implying similar targets, we did not find statistically significant differences in miR-424 subcutaneous adipose tissue expression between obese and non-obese studied individuals. However, we observed miR-424 levels are directly correlated with BMI in the obese group and to higher waist, TSF and CSF measurements in the non-obese group. These findings suggest miR-424 to act in an opposite way of miR-16, in relation to subcutaneous fat accumulation. In a recent study by Zhang *et al.* [31], miR-424 levels have been shown to be increased in cancer cells due to a hypoxia microenvironment leading to apoptosis resistance. Similar, the greater is the adiposity (waist and sum of skinfolds), the higher is the hypoxia in white adipose tissue (WAT) and the miR-424 levels due to an excessive adipocyte number sharing the same vascular supply. These evidence led us to speculate that miR-16 and miR-424 have different roles according to the set of genes in each pathway they regulate. This way, we consider the final result of miR-424 on the outcome depends of a fine and delicate balance of its duality shown so far: on one side, being overexpressed in hypoxia and, on the other, acting as an inhibitor of angiogenic factors. Therefore, due to these data, more studies are necessary to explain this duality mentioned above.

In relation to miR-27, our results have shown that higher levels of miR-27b in non-obese individuals were correlated to wider waist measurement. Several authors have implicated it with preadipocyte differentiation [27] [32] [33] [34]. Although miR-27b has never been correlated to waist circumference or to any other anthropometric measurement of subcutaneous fat, as far as we know, Kang *et al.*, [35] have described this miRNA as an inhibitor of adipogenesis. Therefore, by targeting prohibitin (*PHB*), miR-27 induces downregulation of *PPAR γ* and causes mitochondrial impairment, which leads to reduction of adipogenesis, as seen in mouse 3T3-L1 *in vitro* cell line culture [36]. Moreover, its expression has already been related to hypoxia [32], which is increased in obesity. As a result, higher levels of miR-27 are expected to be correlated to higher fat depots measurements, as shown in our analysis.

We are aware that our study presents some limitations. First of all, our research was performed only in female individuals. However, as emphasized by a recent genome-wide association meta-analysis [10], there is a huge sexual dimorphism in the genetic regulation of traits related to fat distribution. Moreover, gender is known to influence miRNA expression in human WAT [37]. As a result, having only women enrolled makes our sample more homogeneous, avoiding gender split and resulting in more robust results. Furthermore, this study has a significant higher number of enrolled individuals when compared with other publications in the same area [28] [26] [38] [37]. Also, as far as we know, there are no other studies correlating subcutaneous fat measurements and miRNAs expression. As our results were generated from *in vivo* human tissue and with very sensitive methodologies, we have a more realistic scenario than studies performed with cultured cells and animal models.

In summary, our findings show that miR-16 was highly overexpressed in non-obese WAT, acting probably as an anti-angiogenic factor by binding *VEGF* and *VEGFR2* genes. In addition, we found significant correlations of miR-27b, and miR-424 expression in women subcutaneous adipose tissue with BMI and anthropometric measurements in obese and non-obese women, suggesting they have a possible role in modulation of body fat distribution, but acting in the opposite direction than miR-16. Furthermore, our data suggest miR-16 and miR-424 may have opposite effects and together they may be, at least in part, responsible for the fine tuning of adipogenesis in the adipose tissue. Considering the complex network of miRNA regulation, those results need to be further explored and validated in other studies. Hence, because the prevalence of obesity poses a huge clinical burden, innovative strategies to understand

the molecular mechanisms that underlie normal and pathophysiological regulation of adipose tissue are needed.

Acknowledgements

This work has been financially supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil). A.S.G. and D.O.B. received scholarships from the REUNI program from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

References

1. Ogden, C.L., et al., *Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012*. JAMA, 2014. **311**(8): p. 806-14.
2. Cao, Y., *Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity*. J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2362-8.
3. Suganami, T. and Y. Ogawa, *Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(1): p. 33-9.
4. Enlund, E., et al., *Establishment of lipofection for studying miRNA function in human adipocytes*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e98023.
5. Alexander, R., H. Lodish, and L. Sun, *MicroRNAs in adipogenesis and as therapeutic targets for obesity*. Expert Opin Ther Targets, 2011.
6. Ono, K., *MicroRNA links obesity and impaired glucose metabolism*. Cell Res, 2011. **21**(6): p. 864-6.
7. Chang, R.C., et al., *MicroRNAs Control Macrophage Formation and Activation: The Inflammatory Link between Obesity and Cardiovascular Diseases*. Cells, 2014. **3**(3): p. 702-12.
8. Guo, H., et al., *Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 835-40.
9. Locke, A.E., et al., *Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology*. Nature, 2015. **518**(7538): p. 197-206.
10. Shungin, D., et al., *New genetic loci link adipose and insulin biology to body fat distribution*. Nature, 2015. **518**(7538): p. 187-96.
11. Cao, Y., *Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(2): p. 107-15.
12. Heneghan, H.M., N. Miller, and M.J. Kerin, *Role of microRNAs in obesity and the metabolic syndrome*. Obes Rev, 2009. **11**(5): p. 354-61.
13. Gray, D.S., et al., *Skinfold thickness measurements in obese subjects*. Am J Clin Nutr, 1990. **51**(4): p. 571-7.
14. Hastings, E.S., R.H. Anding, and A.B. Middleman, *Correlation of Anthropometric Measures Among Obese and Severely Obese Adolescents and Young Adults*. ICAN: Infant, Child, & Adolescent Nutrition, 2011. **v.3 n.3**: p. 171 - 174.
15. *TargetScanHuman 6.2*. 2006 - 2012, Whitehead Institute for Biomedical Research. <http://www.targetscan.org/>.
16. Griffiths-Jones, S., *miRBase: the microRNA sequence database*. Methods Mol Biol, 2006. **342**: p. 129-38.
17. Lagana, A., et al., *miRo: a miRNA knowledge base*. Database (Oxford), 2009. **2009**: p. bap008.
18. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 611-22.
19. Abramson, J.H., *WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential*. Epidemiol Perspect Innov, 2011. **8**(1): p. 1.
20. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
21. Hua, Z., et al., *MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia*. PLoS One, 2006. **1**: p. e116.
22. Chamorro-Jorganes, A., et al., *MicroRNA-16 and microRNA-424 regulate cell-autonomous angiogenic functions in endothelial cells via targeting vascular*

- endothelial growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-1*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(11): p. 2595-606.
23. Holmes, K., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition*. *Cell Signal*, 2007. **19**(10): p. 2003-12.
 24. Bandi, N., et al., *miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer*. *Cancer Res*, 2009. **69**(13): p. 5553-9.
 25. Elias, I., S. Franckhauser, and F. Bosch, *New insights into adipose tissue VEGF-A actions in the control of obesity and insulin resistance*. *Adipocyte*, 2013. **2**(2): p. 109-12.
 26. Ortega, F.J., et al., *MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation*. *PLoS One*, 2010. **5**(2): p. e9022.
 27. Xie, H., B. Lim, and H.F. Lodish, *MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity*. *Diabetes*, 2009. **58**(5): p. 1050-7.
 28. Kloting, N., et al., *MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue*. *PLoS One*, 2009. **4**(3): p. e4699.
 29. Heneghan, H.M., et al., *Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. **96**(5): p. E846-50.
 30. Neville, M.J., et al., *Comprehensive human adipose tissue mRNA and microRNA endogenous control selection for quantitative real-time-PCR normalization*. *Obesity (Silver Spring)*, 2011. **19**(4): p. 888-92.
 31. Zhang, D., et al., *Hypoxia-induced miR-424 decreases tumor sensitivity to chemotherapy by inhibiting apoptosis*. *Cell Death Dis*, 2014. **5**: p. e1301.
 32. Lin, Q., et al., *A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis*. *FEBS J*, 2009. **276**(8): p. 2348-58.
 33. Karbiener, M., et al., *microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **390**(2): p. 247-51.
 34. Kim, S.Y., et al., *miR-27a is a negative regulator of adipocyte differentiation via suppressing PPARgamma expression*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **392**(3): p. 323-8.
 35. Kang, T., et al., *MicroRNA-27 (miR-27) targets prohibitin and impairs adipocyte differentiation and mitochondrial function in human adipose-derived stem cells*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(48): p. 34394-402.
 36. Liu, D., et al., *Mitochondrial dysfunction and adipogenic reduction by prohibitin silencing in 3T3-L1 cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e34315.
 37. Martinelli, R., et al., *miR-519d overexpression is associated with human obesity*. *Obesity (Silver Spring)*, 2010. **18**(11): p. 2170-6.
 38. Estep, M., et al., *Differential expression of miRNAs in the visceral adipose tissue of patients with non-alcoholic fatty liver disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2010. **32**(3): p. 487-97.
 39. Fiedler, J. and T. Thum, *MicroRNAs looping around angiogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(11): p. 2367-8.
 40. Xu, G., et al., *Modulation of hsa-miR-26b levels following adipokine stimulation*. *Mol Biol Rep*, 2013. **40**(5): p. 3577-82.
 41. Song, G., et al., *The role of microRNA-26b in human adipocyte differentiation and proliferation*. *Gene*, 2013. **533**(2): p. 481-7.

42. Smits, M., et al., *Myc-associated zinc finger protein (MAZ) is regulated by miR-125b and mediates VEGF-induced angiogenesis in glioblastoma*. *FASEB J*, 2012. **26**(6): p. 2639-47.
43. He, J., et al., *Roles and mechanism of miR-199a and miR-125b in tumor angiogenesis*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e56647.
44. Strum, J.C., et al., *MicroRNA 132 regulates nutritional stress-induced chemokine production through repression of SirT1*. *Mol Endocrinol*, 2009. **23**(11): p. 1876-84.
45. Zhang, J., et al., *Curcumin promotes apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through miR-186* signaling pathway*. *Oncol Rep*, 2010. **24**(5): p. 1217-23.
46. Zhou, L., et al., *MicroRNAs miR-186 and miR-150 down-regulate expression of the pro-apoptotic purinergic P2X7 receptor by activation of instability sites at the 3'-untranslated region of the gene that decrease steady-state levels of the transcript*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(42): p. 28274-86.
47. Zhuang, G., et al., *A novel regulator of macrophage activation: miR-223 in obesity-associated adipose tissue inflammation*. *Circulation*, 2012. **125**(23): p. 2892-903.
48. Lu, H., R.J. Buchan, and S.A. Cook, *MicroRNA-223 regulates Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism*. *Cardiovasc Res*, 2010. **86**(3): p. 410-20.

Table 1. Selected miRNAs and identified target genes through online databases* and literature data.

miRBase ID	Mature miRNA sequence	Predicted target	Reference
hsa-miR-16-5p	UAGCAGCACGUAUUUUGGCG	VEGF/ VEGFR2	[39]
hsa-miR-26b-5p	UUCAAAGUAAUUCAGGAUAGGU	TNFA/ LEPT/ RESIST/ AP2/ C/EBP α / PPARG/ HSL	[40] [41]
hsa-miR-27a-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCGCG	PPARG/ PHB	[34] [32] [35]
hsa-miR-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	PPARG/ PHB	[33] [35]
hsa-miR-125b-5p	UCCUGAGACCCUAAACUUUGUGA	VEGF	[42] [43]
hsa-miR-132-3p	UAACAGUCUACAGCCAUUGGUCCG	SIRT1/ CREB	[44] [28]
hsa-miR-186-5p	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU	CASP10/ P2RX7	[45] [46]
hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	PKNOX1/ GLUT4	[47] [48]
hsa-miR-424-3p	CAAAACGUGAGGGCCUGCUAU	VEGF/ VEGFR	[39]
hsa-miR-424-5p	CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGAA	VEGF/ VEGFR	[39]
hsa-miR-519d-3p	CAAAGUCCUCCUUUAGAGUG	PPARG/ PPARA	[37]

Vascular endothelial growth factor (VEGF); vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2); tumor necrosis factor alpha (TNFA); leptin (LEPT); resistin (RESIST); adipocyte lipid-binding protein (AP2), CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α); peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG); prohibitin (PHB); hormone-sensitive lipase (HSL); sirtuin-1 (SIRT1); cAMP responsive element binding protein (CREB); caspase-10 (CASP10); P2X7 receptor gene (P2RX7); PBX/knotted 1 homeobox 1 (PKNOX1); solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 (GLUT4); peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARA).

* TargetScanHuman [15] miRBase [16] and miRò [17] databases.

Table 2. Biodemographic characteristics of the studied samples.

Characteristic	Group		P value
	Non-obese (N=19)	Obese (N=21)	
Demographic			
Age (years)	41.1 ± 12.9	42.8 ± 9.9	0.641 ^a
Clinical			
BMI (kg/m ²)*	23.7 ± 1.7 [21.2 – 27.4]	49.3 ± 10.2 [33.0 – 73.0]	<0.001 ^a
Weight (kg)	60.5 ± 5.4	123.9 ± 24.0	<0.001 ^a
Leptin (ng/dL)	4.4 ± 2.6	38.1 ± 18.6	<0.001 ^a
Adiponectin (ng/dL)*§	23.2 ± 8.7	18.0 ± 7.9	0.039 ^a
Resistin (ng/dL)*	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.272 ^a
Diabetes ^{&}	NA	11 (55%)	
Dyslipidemia ^{&}	NA	12 (60%)	
Hypertension ^{&}	NA	16 (80%)	
Physical activity[#]			
yes	14 (73.68%)	6 (28.57%)	0.011 ^b
no	5 (26.32%)	15 (71.43%)	
Smoking			
yes	0	2 (9.52%)	0.488 ^c
no	19 (100%)	19 (90.48%)	

BMI, body mass index [minimum – maximum]; ^a Student's t-test for independent samples; ^b chi-squared-test with Yates correction; ^c Fisher's exact test; [§] test performed without outlier individual n°143 (obese group); *variable transformed in ln; [&] Prevalence data available only for twenty obese individuals; NA, not available; [#] At least one hour/twice a week.

Table 3. Expression of selected miRNAs in obese and non-obese women.

microRNA	Non-Obese		Obese		Fold change obese/non-obese	P value
	Mean \pm SD	Median [quartiles]	Mean \pm SD	Median [quartiles]		
hsa-miR-16-5p	12.21 \pm 23.86	6.02 [3.23 - 10.21]	0.08 \pm 0.04	0.08 [0.06 - 0.08]	-151.121	<0.001 ^a
hsa-miR-26b-5p	0.28 \pm 0.18 (18)	0.36 [0.11 - 0.43] (18)	0.35 \pm 0.36	0.32 [0.17 - 0.38]	1.257	0.933 ^a
hsa-miR-27a-3p	0.07 \pm 0.05	0.08 [0.01 - 0.11]	0.15 \pm 0.33	0.08 [0.03 - 0.12]	2.074	0.616 ^a
hsa-miR-27b-3p	0.07 \pm 0.05 (18)	*	0.06 \pm 0.04	*	-1.148	0.578 ^b
hsa-miR-125b-5p	0.43 \pm 0.37	0.43 [0.16 - 0.51]	0.44 \pm 0.39	0.45 [0.20 - 0.49]	1.025	0.860 ^a
hsa-miR-132-3p	0.08 \pm 0.06	*	0.09 \pm 0.05	*	1.164	0.929 ^b
hsa-miR-186-5p	0.24 \pm 0.14 (17)	0.22 [0.15 - 0.33] (17)	0.27 \pm 0.17 (19)	0.23 [0.18 - 0.34] (19)	1.139	0.516 ^a
hsa-miR-223-3p	1.46 \pm 1.22	1.27 [0.34 - 2.24]	2.06 \pm 2.68	1.35 [0.67 - 2.38]	1.41	0.636 ^a
hsa-miR-424-3p	0.001 \pm 0.0008 (15)	0.001 [0.0007 - 0.015] (15)	0.003 \pm 0.007 (18)	0.001 [0.0005 - 0.018] (18)	2.584	0.971 ^a
hsa-miR-424-5p	0.0009 \pm 0.0008 (17)	0.0008 [0.0003 - 0.0015] (17)	0.001 \pm 0.0009 (18)	0.0009 [0.0005 - 0.0013] (18)	1.228	0.531 ^a
hsa-miR-519d-3p	0.0008 \pm 0.0009 (16)	0.0005 [0.0001 - 0.001] (16)	0.001 \pm 0.002 (20)	0.0007 [0.0003 - 0.002] (20)	1.851	0.161 ^a

Data presented as 2^{-^ΔΔC_t} mean \pm SD and median [quartiles], when deviating significantly from the normal distribution; (number of individuals when different of the group); fold change values where calculated with mean; fold change lower than one have been reversed; ^a Mann-Withney U test; ^b Student's t-test for independent samples; *Median value not shown due to the symmetric distribution of the variable.

Artigo 2

Aceito para publicação no periódico Genetics and Molecular Biology

Fator de impacto: 1,341

Adiponectin promoter polymorphisms are predictors of lipid profile improvement after bariatric surgery.

Aline S. Gasparotto¹, Diego O. Borges¹, Marília R. Zandoná¹, Mauricio J. Ramos², Nelson G. Meihardt² and Vanessa S. Mattevi¹

¹ *Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.*

² *Centro de Atenção ao Obeso Classe III, Hospital Nossa Senhora da Conceição, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil.*

Short title: adiponectin and lipid profile.

Corresponding author:

Vanessa Suñé Mattevi

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Rua Sarmiento Leite, 245, prédio 1, sala 309

CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil

Phone: +55-51-33038763,

e-mail: vmattevi@ufcspa.edu.br

Abstract

Our aim was to investigate if single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in the 5' regions of leptin (*LEP*, -2548 G>A, rs7799039), resistin (*RETN*, -420 C>G, rs1862513) and adiponectin (*ADIPOQ*, -11391 G>A, rs17300539 and -11377 C>G, rs266729) genes were related to changes in body mass index (BMI) and metabolic variables after bariatric surgery in 60 extremely obese individuals. At baseline, *ADIPOQ* -11391 A-allele carriers showed higher plasma adiponectin and lower total cholesterol levels when compared to G/G homozygotes. Approximately 32 months post-surgery, a mean reduction of 35% in BMI and an important improvement in metabolic profiles were observed. In addition, for the *ADIPOQ* -11377 polymorphism, a higher decrease in lipid profile was associated to the C/C genotype. Moreover, individuals bearing the A-C haplotype for the two *ADIPOQ* SNPs were more prone to show a reduction in low-density lipoprotein levels after bariatric surgery (-43.0% A-C carriers vs. -18.1% G-G carriers, p=0.019). We did not find any association of leptin and resistin SNPs with the clinical parameters analyzed. In summary, our results indicate that the A-C haplotype is a predictor of better lipid profile post-surgery and the studied SNPs in *ADIPOQ* gene are associated to changes in metabolic variables in obese individuals.

Keywords: Adiponectin, polymorphism, obesity, lipid profile, bariatric surgery

Introduction

Obesity is a health problem that affects not only the welfare of individuals worldwide, but also the economy, representing a heavy burden to public health systems (Krzysztozek *et al.*, 2015). To loose and maintain weight loss is not an easy goal for most people. Efficacious and safe pharmacological treatments are still lacking and lifestyle modifications are currently the first choice treatment to the excess of body weight. Surgical interventions are being highly used to treat patients with morbid obesity (body mass index, BMI, equal or over 40 kg/m²). However, there is a high inter-subject variability among surgical outcomes (Sevilla and Hubal, 2014).

Genetic factors have been demonstrated to explain almost 70% of BMI variability (Visscher *et al.*, 2012; Zaitlen *et al.*, 2013). Due to these high estimates of body weight heritability and to inter-individual differences observed in response to bariatric surgery, the role of individual genetic background on outcomes of this intervention becomes an important gap in the present knowledge.

Since 1948, proteins secreted by adipose tissue, i.e. adipokines, have been related to energy expenditure regulation through both central and endocrine actions (Wertheimer and Shapiro, 1948). Moreover, excess of adipose tissue in obesity has been shown to disturb adipokine signalling and to be linked to insulin resistance, hyperglycemia, increased risk of cardiovascular diseases and dyslipidemia (Antuna-Puente *et al.*, 2008; Leal and Mafra, 2013). Three adipokines, namely leptin, resistin, and adiponectin, known to play important roles in the modulation of the metabolic adverse effects associated with the excess of adipose tissue, have been chosen as the focus of the present study. Leptin acts inhibiting appetite and food intake and stimulating energy expenditure. However, circulating leptin levels produced by adipose tissue are increased in obese subjects, probably due to the existence of leptin resistance.

Resistin is also an adipocyte-specific secreted adipokine with conflicting reports of its potency in metabolic diseases in humans. However, several studies have consistently reported a close relationship between resistin levels and obesity, insulin resistance, or type 2 diabetes. On the other hand, adiponectin levels are low in obese subjects, and this adipokine produces insulin-sensitizing effects (reviewed in Jung and Choi, 2014). Therefore, it has been proposed that genetic variation influencing adipokine action can also alter many physiological and pathological mechanisms (Breitfeld *et al.*, 2012).

Variations in regulatory regions of genes encoding adipokines have been associated with obesity-related phenotypes by our group and others (Mammes *et al.*, 2000; Mattevi *et al.*, 2002; Mattevi *et al.*, 2004; Norata *et al.*, 2007; Ben Ali *et al.*, 2009). These findings strengthen the connection between adipokines and obesity. However, the role of these variants in longitudinal studies and in response to bariatric surgery has been far less investigated. Therefore, our aim was to investigate if single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in the 5' regions of leptin, resistin and adiponectin genes are related to a different profile of weight loss and/or changes in metabolic variables evaluated before and after gastric reduction surgery in obese individuals.

Materials and Methods

Sixty obese subjects undergoing elective gastric bypass abdominal surgery [Roux-en Y gastroenterostomy, which has been considered the gold standard for surgical treatment of obesity in the United States (Barnett, 2013)] were recruited at the Obese Class III outpatient clinic at a government-supported hospital in Rio Grande do Sul, Brazil. Inclusion criteria were body mass index [BMI, calculated as (weight in kg) / (height in m)²] equal or over 40 kg/m² or BMI equal or over 35 kg/m² with associated

comorbidities (type 2 diabetes, sleep apnea, hypertension, dyslipidemia, cardiovascular diseases, or osteoarthritis). Individuals were excluded in presence of serious hepatic disease, cancer, coagulation disorders or stomach diseases.

In order to characterize the sample, information about birth, ethnicity, gender, physical activity, smoking, use of oral contraceptives, menopausal status, weight, height, presence of type 2 diabetes and hypertension were obtained from medical files recorded at the time of the surgery. In addition, as part of the patient's routine care, laboratory variables information (fasting total cholesterol, low-density lipoprotein, high-density lipoprotein, glucose, triglycerides and glycosylated hemoglobin) were collected in two different moments: a) pre-surgery (baseline); and b) after 32 ± 7 months post-surgery. Serum insulin and reactive C protein levels were available for only a few individuals, so these variables were not further analyzed.

Plasma levels of leptin, resistin and adiponectin were measured in pre-surgery fasting blood samples using the Human Leptin, Resistin, and Adiponectin Elisa Kits, respectively (EMD Millipore Corporation, Missouri, USA). Plasma samples for these measurements were available for only 43 individuals.

SNPs Genotyping

Fasting whole blood samples were collected during surgery and DNA was extracted using a standard salting out technique (Lahiri and Nurnberger, 1991). We conducted polymerase chain reactions (PCR) targeting regions containing polymorphisms located in the genes encoding leptin (*LEP* -2548G>A; rs7799039, data available for 53 individuals due to unsuccessful genotyping of some samples) and resistin (*RETN* -420C>G; rs1862513, available for 50 individuals) using primers and reaction conditions previously described (Mammes *et al.*, 2000; Engert *et al.*, 2002).

Digestion of PCR products with the enzymes *HhaI* for *LEP*-2548 G>A and *BpiI* for *RETN* -420C>G was conducted afterwards. Restriction fragment length analysis was performed in agarose gels (2.5%) containing ethidium bromide to determine genotypes. Two variants in the promoter region of the adiponectin (*ADIPOQ*) gene (-11377 C>G; rs266729, obtained for 57 individuals and -11391 G>A; rs17300539, obtained for 56 individuals) were genotyped in a StepOnePlus™ real-time PCR System (Life Technologies®, California, USA), using hydrolysis probes for allele discrimination. Negative and positive controls were included in all analyses. Five percent of all samples were repeated for genotype confirmation. Selection of SNPs was based in previous results obtained by our group regarding their associations with anthropometric or metabolic phenotypes in the Brazilian population (Mattevi *et al.*, 2002; Mattevi *et al.*, 2004; Trinca *et al.*, 2010).

Statistical Analyses

Variables used for sample characterization are expressed as mean \pm standard deviation or frequency (%). Asymmetrically distributed continuous variables are presented as medians [interquartile range]. Allele frequencies were calculated and agreement of genotype frequencies with Hardy-Weinberg expectations was tested through a goodness-of-fit chi-squared test. Pairwise linkage disequilibrium coefficients (D' , standardized linkage disequilibrium, and r^2 , squared correlation coefficient) were estimated using the Haploview software (Barrett *et al.*, 2005).

Mean biochemical and anthropometric parameters at baseline and % change after surgery were compared among the different genotypes using Kruskal-Wallis and Mann-Whitney-U tests. Prior to analyses, the changes in biochemical and anthropometric variables were adjusted by linear regressions for the time interval

between data collections. These adjusted values are presented in Table 4 and Figure 1. Age, menopausal status and gender did not show significant correlation with biochemical and anthropometric measurements in previous univariate analyses; therefore, they were not included in adjustments. All tests were two-tailed, and the significance level was pre-defined at < 0.05 . Data presented herein are limited to exploratory analyses and, therefore, multiple tests correction has not been performed. All statistical analyses were conducted using IBM SPSS Statistics version 20.0.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

Ethical Considerations

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study. All procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards of the institutional research committees (protocol numbers 11-105, UFCSPA, and 481/11, Grupo Hospitalar Conceição).

Results

Selected clinical characteristics of the 60 individuals from this study are presented in Table 1. The studied sample was almost completely constituted by women (91.7%) and euro-descendants (95.0%), with a mean age of 42.3 ± 8.9 years. The majority of patients did not smoke (93.3%) and 83.6% of women did not make use of oral contraceptives. Six of the enrolled women were postmenopausal. Other clinical variables at baseline are described in Table 1.

All genotype frequencies were in agreement with those expected under Hardy-Weinberg equilibrium. Minor allele frequency for *LEP* -2548 G>A was 0.39 (A), for *RETN* -420C>G was 0.31(G), for *ADIPOQ* -11391 G>A was 0.11 (A), and for *ADIPOQ* -11377 C>G was 0.31 (G). Three haplotypes resulting from the combination of the two

SNPs in the *ADIPOQ* gene were observed, G-C, G-G and A-C, with the following frequencies: 0.58, 0.31 and 0.11, respectively. Linkage disequilibrium coefficients were also calculated for these two SNPs. D' and r-squared values were 0.208 and 0.002, respectively.

The relationship between each one of the SNPs located in *LEP*, *RETN* and *ADIPOQ* coding genes and circulating concentrations of their respective proteins was investigated through comparison of median adipokine levels among genotypes (Table 2). *ADIPOQ* -11391 A-allele carriers showed higher plasma adiponectin levels when compared to homozygotes for the G allele (19.5 versus 12.4 ug/ml, p=0.045, respectively). Leptin and resistin plasma levels were not different among genotypes for SNPs located in their respective encoding genes.

In addition, we compared BMI and other biochemical parameters [triglycerides, total cholesterol, low density lipoprotein (LDL) and high density lipoprotein (HDL) cholesterol, glycosylated hemoglobin and glucose levels] among genotypes before surgery. *ADIPOQ* -11391 G/G homozygotes showed higher total cholesterol levels than A-allele carriers (212.1 vs. 182.9 mg/dL, p=0.019). Other parameters were not different between these and other genotypes (data not shown).

The second data collection for blood analysis was performed after 32 ± 7 months post-surgery. Only one patient was lost after follow-up. As shown in Table 3, mean BMI reduction was 35.0% after this period. All metabolic parameters evaluated presented lower values after the surgical procedure, with exception of HDL-cholesterol, which was higher than before surgery, as expected.

The possible relationship of the gene polymorphisms investigated with response to bariatric surgery was evaluated through comparison of mean BMI variation and changes in metabolic variables (lipid and glucose serum levels) between genotypes of

the studied SNPs. *ADIPOQ* -11377 C/C individuals have shown higher reduction of LDL cholesterol, total cholesterol and triglycerides when compared to G-allele carriers (Table 4). When this analysis was conducted among *ADIPOQ* -11391 and -11377 haplotype combinations, a higher LDL cholesterol reduction was associated to A-C haplotype carriers when compared to carriers of the G-G haplotype (Figure 1, -43.0 vs. -18.1%, $p=0.019$). For other genetic variants analyzed no statistical significant differences were found (data not shown).

Discussion

Bariatric surgery has been shown to be an effective treatment for extreme obesity. Morbid obesity is usually associated with development of dyslipidemia, insulin resistance and other metabolic disturbances (Gutierrez *et al.*, 2009; Farb *et al.*, 2011). In our sample, mean BMI reduction was 35.0% after surgical intervention. Our data also show an important improvement in lipid and glycemic profiles after bariatric surgery. However, the relationship between genetic background and bariatric surgery outcomes remains to be elucidated. In the present study, we longitudinally examined the possible role of polymorphisms located in three adipokine encoding genes in the modulation of surgical weight loss and lipid and glucose-related metabolic parameters.

Adiponectin was identified in the beginning of the 1990s, being the most abundant transcript produced by adipose tissue (Maeda *et al.*, 1996). Plasma adiponectin levels are known to be negatively correlated with body fat mass. It is also well-known that adiponectin has insulin-sensitizing effects. This protein also induces activation of lipoprotein lipase enzyme, thereby enhancing very-low density lipoprotein clearance and thus decreasing plasma triglyceride levels (Berneis and Krauss, 2002), therefore acting as an anti-atherogenic adipokine. In addition, adiponectin has important

anti-inflammatory properties. Although not fully established, this adipokine could act by reducing anti-inflammatory molecules expression and by inhibiting macrophage transformation to foam cells, for example (Ouchi and Walsh, 2007).

Although all individuals analyzed herein were extremely obese in a stable weight situation before surgery, we observed that A-allele carriers for the *ADIPOQ* -11391G>A SNP showed higher adiponectin plasma levels than G-allele homozygotes. Similar results were previously reported in a study performed in obese subjects before bariatric surgery in France (Poitou *et al.*, 2005) and also by our group in a sample of HIV-infected patients on highly-active antiretroviral therapy, where A-allele carriers showed higher adiponectin plasma levels than other genotypes (Trinca *et al.*, 2010). Furthermore, we observed that A-allele carriers had lower baseline total cholesterol levels than G/G homozygotes for this SNP. Despite similar results in the literature data related to the lipid profile were not found, the *ADIPOQ* -11391 A-allele has been already associated with lower risk of type 2 diabetes in obese adults (Vasseur *et al.*, 2005; Goyenechea *et al.*, 2009). For this reason, we believe this allele could imply in a metabolic advantage for obese individuals, which needs to be further explored in future studies.

For the second *ADIPOQ* polymorphism analyzed, -11377 C>G, C-allele homozygotes presented higher reduction in LDL cholesterol, total cholesterol and triglycerides than carriers of the variant G-allele. Higher levels of total and LDL cholesterol were associated to the G/G genotype in a previous study by our group performed in 3-4 years-old children from Brazil (Zandona *et al.*, 2013). Although there were differences in enrolled individuals, both results suggest C/C genotype as a predictor of a better response in circulating lipids after surgery, since the higher decreases were reported in this group.

Both studied SNPs are located in the promoter region of the *ADIPOQ* gene and have already been associated with adiponectin levels (Bouatia-Naji *et al.*, 2006). However, previous characterization of the *ADIPOQ* gene promoter did not identify binding sites for transcription factors at or around both SNPs (Schaffler *et al.*, 1998). Although linkage disequilibrium coefficients between the two variants studied in the *ADIPOQ* gene were quite low in the present sample, we (Trinca *et al.*, 2010) and others (Poitou *et al.*, 2005) have found significant linkage disequilibrium between these two SNPs in previous studies. Thus, we believe the small D' and r^2 estimates found herein are most likely due to sample size, because we had a low number of carriers of the -11391 A allele (only 11). Evidence presented herein allow us to speculate that these SNPs may be in linkage disequilibrium with an unknown functional site in this region, which would explain the consistent associations of the A-C haplotype with adiponectin levels found in different studies, as also suggested by Kyriakou and colleagues (Kyriakou *et al.*, 2008).

Associations of *LEP* -2548 G>A and *RETN* -420C>G SNPs with their plasma levels and other metabolic parameters mentioned above were not found herein. The same result was reported by our group in human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals for the *LEP* gene SNP (Trinca *et al.*, 2010) and by Ortega and colleagues (Ortega *et al.*, 2014) in prepubertal children and adolescents and by Menzaghi and colleagues (Menzaghi *et al.*, 2006) in non-diabetic Caucasians for the *RETN* variant. The results suggest that the variants located at leptin and resistin genes are not associated with the parameters determined in this study.

One limitation of our study is the high proportion of women in our sample, limiting the extrapolation of our results to the male gender. Other weak point is the lack of post-surgical adipokines measurements, which would have enriched our results. We

are also aware that only a few polymorphisms in the candidate genes were analyzed in the present study, so we cannot rule out the role of other variants in these genes on the modulation of the outcomes of bariatric surgery.

In summary, based on the data presented herein, we suggest that morbid obese individuals bearing the A-C haplotype for the *ADIPOQ* -11391 and -11377 SNPs are prone to show a higher reduction in circulating lipid levels after bariatric surgery than other subjects, therefore having more benefits from this intervention. Future studies should focus on the role of the adiponectin-signaling pathway over weight loss interventions and improvement in circulating lipids profile to validate these results and to introduce genetic analyses in evaluations before clinical practice decisions.

Acknowledgements

Financial support was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil).

References

- Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP (2008) Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* 34: 2-11.
- Barnett SJ (2013) Bariatric surgical management of adolescents with morbid obesity. *Curr Opin Pediatr* 25: 515-520.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263-265.
- Ben Ali S, Kallel A, Ftouhi B, Sediri Y, Feki M, Slimane H, Jemaa R, Kaabachi N (2009) Association of G-2548A LEP polymorphism with plasma leptin levels in Tunisian obese patients. *Clin Biochem* 42: 584-588.
- Berneis KK, Krauss RM (2002) Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res* 43: 1363-1379.
- Bouatia-Naji N, Meyre D, Lobbens S, Seron K, Fumeron F, Balkau B, Heude B, Jouret B, Scherer PE, Dina C *et al.* (2006) ACDC/adiponectin polymorphisms are associated with severe childhood and adult obesity. *Diabetes* 55: 545-550.
- Breitfeld J, Stumvoll M, Kovacs P (2012) Genetics of adiponectin. *Biochimie* 94: 2157-2163.
- Engert JC, Vohl MC, Williams SM, Lepage P, Loredon-Osti JC, Faith J, Dore C, Renaud Y, Burt NP, Villeneuve A *et al.* (2002) 5' flanking variants of resistin are associated with obesity. *Diabetes* 51: 1629-1634.
- Farb MG, Bigornia S, Mott M, Tanriverdi K, Morin KM, Freedman JE, Joseph L, Hess DT, Apovian CM, Vita JA *et al.* (2011) Reduced adipose tissue inflammation represents an intermediate cardiometabolic phenotype in obesity. *J Am Coll Cardiol* 58: 232-237.
- Goyenechea E, Collins LJ, Parra D, Abete I, Crujeiras AB, O'Dell SD, Martinez JA (2009) The -11391 G/A polymorphism of the adiponectin gene promoter is associated with metabolic syndrome traits and the outcome of an energy-restricted diet in obese subjects. *Horm Metab Res* 41: 55-61.
- Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hasty AH (2009) Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr Diab Rep* 9: 26-32.
- Jung UJ, Choi MS (2014) Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 15: 6184-223.
- Krzysztosek J, Wierzejska E, Zielinska A (2015) Obesity. An analysis of epidemiological and prognostic research. *Arch Med Sci* 11: 24-33.

- Kyriakou T, Collins LJ, Spencer-Jones NJ, Malcolm C, Wang X, Snieder H Swaminathan R, Burling KA, Hart DJ, Spector TD *et al.* (2008) Adiponectin gene ADIPOQ SNP associations with serum adiponectin in two female populations and effects of SNPs on promoter activity. *J Hum Genet* 53: 718-727.
- Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19: 5444.
- Leal VO, Mafra D (2013) Adipokines in obesity. *Clin Chim Acta* 419: 87-94.
- Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K (1996) cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221: 286-289.
- Mammes O, Betoulle D, Aubert R, Herbeth B, Siest G, Fumeron F (2000) Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the LEP gene with overweight. *Ann Hum Genet* 64: 391-394.
- Mattevi VS, Zembrzuski VM, Hutz MH (2002) Association analysis of genes involved in the leptin-signaling pathway with obesity in Brazil. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 1179-1185.
- Mattevi VS, Zembrzuski VM, Hutz MH (2004) A resistin gene polymorphism is associated with body mass index in women. *Hum Genet* 115: 208-212.
- Menzaghi C, Coco A, Salvemini L, Thompson R, De Cosmo S, Doria A, Trischitta V (2006) Heritability of serum resistin and its genetic correlation with insulin resistance-related features in nondiabetic Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 2792-2795.
- Norata GD, Ongari M, Garlaschelli K, Tibolla G, Grigore L, Raselli S, Vettoretti S, Baragetti I, Noto D, Cefalu AB *et al.* (2007) Effect of the -420C/G variant of the resistin gene promoter on metabolic syndrome, obesity, myocardial infarction and kidney dysfunction. *J Intern Med* 262: 104-112.
- Ortega L, Navarro P, Riestra P, Gavela-Perez T, Soriano-Guillen L, Garces C (2014) Association of resistin polymorphisms with resistin levels and lipid profile in children. *Mol Biol Rep* 41: 7659-7664.
- Ouchi N, Walsh K (2007) Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clin Chim Acta* 380: 24-30.
- Poitou C, Lacorte JM, Coupaye M, Bertrais S, Bedel JF, Lafon N, Bouillot JL, Galan P, Borson-Chazot F, Basdevant A *et al.* (2005) Relationship between single nucleotide polymorphisms in leptin, IL6 and adiponectin genes and their circulating product in morbidly obese subjects before and after gastric banding surgery. *Obes Surg* 15: 11-23.

- Schaffler A, Langmann T, Palitzsch KD, Scholmerich J, Schmitz G (1998) Identification and characterization of the human adipocyte apM-1 promoter. *Biochim Biophys Acta* 1399: 187-197.
- Sevilla S, Hubal MJ (2014) Genetic modifiers of obesity and bariatric surgery outcomes. *Semin Pediatr Surg* 23: 43-48.
- Trinca JR, Sprinz E, Lazzaretti RK, Hutz MH, Kuhmmer R, de Almeida S, Tibola A, Meirelles GB, Arena-de-Souza RC, Mattevi V S (2010) SNPs in the APM1 gene promoter are associated with adiponectin levels in HIV-infected individuals receiving HAART. *J Acquir Immune Defic Syndr* 55: 299-305.
- Vasseur F, Helbecque N, Lobbens S, Vasseur-Delannoy V, Dina C, Clement K, Boutin P, Kadowaki T, Scherer PE, Froguel P (2005) Hypoadiponectinaemia and high risk of type 2 diabetes are associated with adiponectin-encoding (ACDC) gene promoter variants in morbid obesity: evidence for a role of ACDC in diabetes. *Diabetologia* 48: 892-899.
- Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI, Yang J (2012) Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Genet* 90: 7-24.
- Wertheimer E, Shapiro B (1948) The physiology of adipose tissue. *Physiol Rev* 28: 451-464.
- Zaitlen N, Kraft P, Patterson N, Pasaniuc B, Bhatia G, Pollack S, Price AL (2013) Using extended genealogy to estimate components of heritability for 23 quantitative and dichotomous traits. *PLoS Genet* 9: e1003520.
- Zandona MR, Rodrigues RO, Albiero G, Campagnolo PD, Vitolo MR, Almeida S, Mattevi VS (2013) Polymorphisms in LEPR, PPARG and APM1 genes: associations with energy intake and metabolic traits in young children. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 57: 603-611.

Figure 1 - Comparison of percent variation in total cholesterol and low-density lipoprotein levels following bariatric surgery among *ADIPOQ* -11391 G>A (rs17300539) and -11377 C>G (rs266729) haplotype combinations.

a. Comparison of median %variation in LDL levels among *ADIPOQ* haplotype combinations. Kruskal-Wallis test among the three haplotype combinations, $p=0.029$; Mann-Whitney test used to show difference between G-G carriers and A-C carriers medians, $p=0.019$. *Outlier individual value of Δ LDL%. Δ LDL%, percentual variation in low-density lipoprotein levels;

b. Comparison of median % variation in total cholesterol levels among *ADIPOQ* haplotype combinations. Kruskal-Wallis test among the three haplotype combinations, $p=0.178$. • Outlier individual values of Δ total cholesterol %. Δ , variation.

Data are shown as median and interquartile range adjusted for the time interval between data collections.

Table 1 - Baseline clinical characteristics of the 60 morbidly obese enrolled subjects.

Characteristic	*
Age (years)	42.3 ± 8.9
Women	55 (91.7 %)
Euro-descendants	57 (95.0%)
Smoking	4 (6.7%)
Sedentary	50 (83.3%)
Type 2 diabetes	32 (53.3%)
Hypertension	44 (73.3%)
Dyslipidemia	36 (60.0%)
Metabolic syndrome	40 (66.7%)
BMI (kg/m ²)	50.7 ± 7.8
Abdominal subcutaneous fat thickness (cm)	6.6 ± 1.8
Leptin (ng/mL) ^a	37.3 [24.7-47.3]
Adiponectin (ug/mL) ^a	12.5 [10.2-19.5]
Resistin (ng/mL) ^a	0.59 [0.43-0.80]

^a Adipokine levels available for 43 individuals; *Data shown as mean ± SD, median [interquartile range] or absolute n (%). BMI, body mass index.

Table 2 - Comparison of adipokines (leptin, resistin and adiponectin) plasma levels among their respective encoding-gene polymorphisms genotypes before surgery.

Polymorphism	Genotype (n)	Adipokine*	Interquartil range
		Leptin (ng/mL)	
<i>LEP</i> -2548 G>A (rs7799039)	G/G (24)	36.4	24.8 – 47.8
	A/G (17)	37.3	22.0 – 50.1
	A/A (12)	39.4	32.6 – 42.3
	p	0.988 ^a	
		Resistin (ng/mL)	
<i>RETN</i> -420 C>G (rs1862513)	C/C (22)	0.64	0.44 – 0.92
	G/G+C/G (28)	0.59	0.42 – 0.76
	p	0.422 ^b	
		Adiponectin (µg/mL)	
<i>ADIPOQ</i> -11391 G>A (rs17300539)	G/G (45)	12.4	1.2 – 17.7
	A/A+A/G (11)	19.5	11.9 – 30.4
	p	0.045 ^b	
<i>ADIPOQ</i> -11377 C>G (rs266729)	C/C (26)	13.6	10.9 – 18.9
	G/G+C/G (31)	12.5	10.2 – 25.4
	p	0.921 ^b	

*Data expressed as median and interquartile range; ^a Kruskal-Wallis test; ^b Mann-Whitney U test; n<60 due to unsuccessful genotyping of some samples.

Table 3 – Evolution of anthropometric and metabolic parameters following bariatric surgery.

	Variation					
	Baseline	After surgery	Variation	(%)	p	n
BMI (kg/m ²)	50.3 ± 1.0	32.8 ± 0.7	-17.5 ± 0.8	-35.0	<0.001 ^a	59
Total cholesterol (mg/dl)	202.7 ± 5.1	178.0 ± 3.7	-24.7 ± 5.0	-10.7	<0.001 ^a	57
LDL cholesterol(mg/dl)	125.2 ± 4.6	93.5 ± 3.3	-31.8 ± 4.2	-22.6	<0.001 ^a	56
HDL cholesterol (mg/dl)	48.8 ± 1.3	66.9 ± 1.9	18.2 ± 1.7	41.2	<0.001 ^a	57
Triglycerides (mg/dl)	142.6 ± 8.0	87.5 ± 3.5	-55.1 ± 1.3	-40.3	<0.001 ^b	56
Glucose (mg/dl)	129.1 ± 7.7	91.8 ± 2.7	-37.3 ± 1.2	-21.8	<0.001 ^b	58
Glycosylated hemoglobin						
(%)	6.7 ± 0.3	5.6 ± 0.8	-1.1 ± 0.2	-13.4	<0.001 ^b	53

Data presented as means ± SEM. ^a Paired samples T-test; ^b Wilcoxon test.

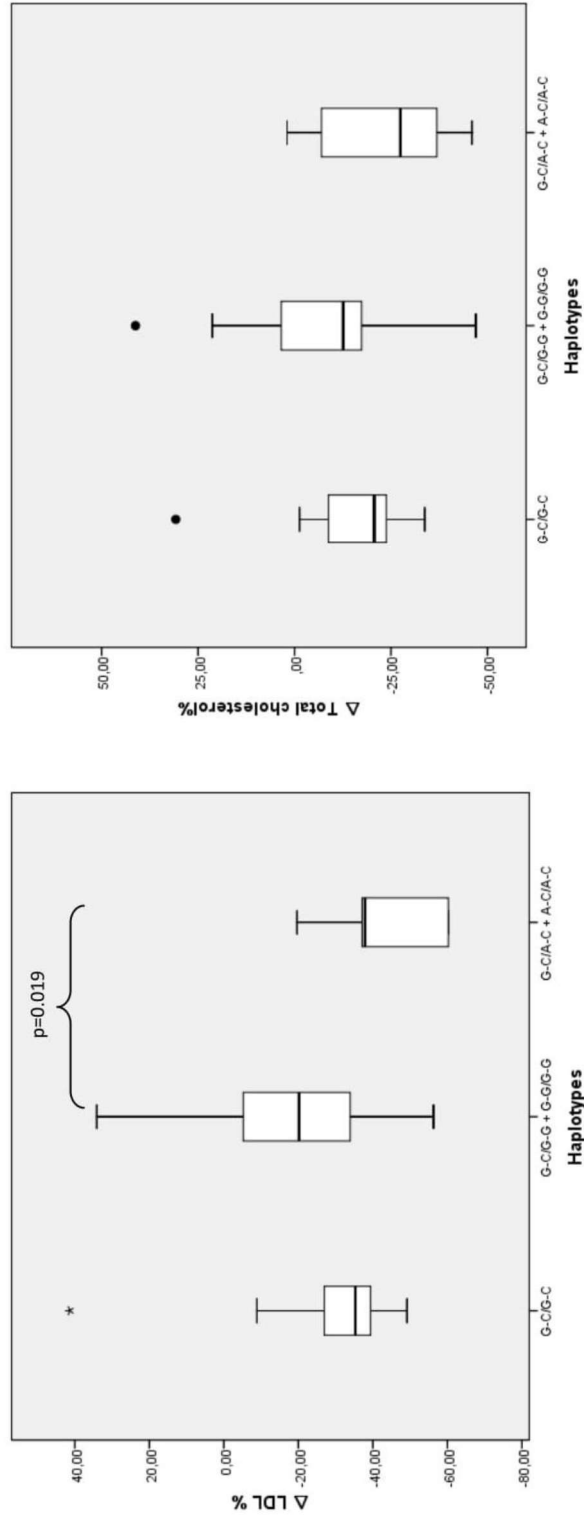
Second data collection performed 35± 6 months (for BMI) and 32 ±7 months (for the other parameters) after surgery; n<60 due to unsuccessful genotyping of some samples. BMI, body mass index; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein.

Table 4 – Percent change in circulating lipids following bariatric surgery according to *ADIPOQ* -11377 C>G (rs266729) genotypes.

	C/C	G/G +C/G	p
Δ LDL %	-37.1 [-40.2 – -20.0]	-18.3 [-32.3 – -4.9]	0.005 ^a
n	23	30	
Δ Cholesterol %	-20.7 [-27.5 – -7.0]	-8.8 [-15.6 – 3.4]	0.038 ^a
n	23	31	
Δ Triglycerides %	-43.1±22.0	-31.1±19.5	0.042 ^b
n	22	31	

All variables have been adjusted for time interval between data collection. Data are expressed as mean ± standard deviation or median and [interquartile range]. ^aMann-Whitney U test; ^bT-Test for independent samples; n<60 due to unsuccessful genotyping of some samples. Δ, variation; LDL, low-density lipoprotein.

Figure 1 - Comparison of percent variation in total cholesterol and low-density lipoprotein levels following bariatric surgery among *ADIPOQ* - 11391 G>A (rs17300539) and -11377 C>G (rs266729) haplotype combinations.



a. Comparison of median %variation in LDL levels among *ADIPOQ* haplotype combinations. Kruskal-Wallis test among the three haplotype combinations, $p=0.029$; Mann-Whitney test used to show difference between G-G carriers and A-C carriers medians, $p=0.019$. *Outlier individual value of Δ LDL%. Δ LDL%, percentual variation in low-density lipoprotein levels;

b. Comparison of median % variation in total cholesterol levels among *ADIPQQ* haplotype combinations. Kruskal-Wallis test among the three haplotype combinations, $p=0.178$. • Outlier individual values of Δ total cholesterol %. Δ , variation.

Data are shown as median and interquartile range adjusted for the time interval between data collections.

4 CONCLUSÃO

O tecido adiposo se comunica com múltiplos órgãos e tecidos através de inúmeras adipocinas e, portanto, influencia grande número de processos fisiológicos e patológicos. Apesar da primeira linha de tratamento contra a obesidade contar com mudanças no estilo de vida e exercício físico, estes métodos são frequentemente insuficientes para normalizar o peso corporal e prevenir complicações decorrentes da obesidade.

Já é sabido que o componente genético exerce grande influência nos fenótipos complexos do excesso de peso e da obesidade. Apesar de estudos de varredura genômica (*genome-wide association studies*, GWAS) terem revelado inúmeras associações genéticas relacionadas a estes fenótipos, a enorme quantidade de informação gerada não foi suficiente para explicar nem um décimo da variabilidade da massa corporal na população. Portanto, a então chamada “herdabilidade perdida”, referente ao componente genético da adiposidade que ainda não foi explicado, pode estar relacionada a variantes genéticas raras nas populações analisadas ou não cobertas pelos *microarrays* comerciais utilizados nos GWAS e ao controle pós-transcricional. Logo, a pesquisa de polimorfismos em regiões gênicas promotoras em diferentes populações e de miRNAs que controlam a expressão de genes envolvidos nas rotas metabólicas da obesidade pode ser uma das respostas para as tentativas de resolver essa questão.

A modulação da angiogênese parece ter um potencial para retardar o desenvolvimento da obesidade. Em particular, a sinalização via VEGF/VEGFR se mostra como alvo promissor. Nossos achados mostraram que o miR-16 está altamente expresso em TAB subcutâneo das pacientes não-obesas, agindo como

um fator anti-angiogênico através da ligação com seus genes-alvos *VEGF* e *VEGFR*. Além disso, nós encontramos correlações significativas da expressão no TAB subcutâneo de miR-27b e miR-424 com o IMC e medidas antropométricas em mulheres obesas e não-obesas. Esses dados sugerem um possível papel desses microRNAs na modulação da distribuição da gordura corporal. Ainda, nossos dados propõem que os miR-16 e miR-424 podem apresentar efeitos opostos e, juntos, serem responsáveis por parte do delicado controle da adipogênese no TAB.

Somando-se a isso, citocinas, proteínas inflamatórias e seus mecanismos de ação podem servir de alvos terapêuticos para tratar desordens associadas com inflamação crônica, intolerância à glicose e dislipidemia. No presente estudo, foi verificado que polimorfismos no gene da adiponectina estão relacionados a perfis diferentes de mudança nas variáveis metabólicas avaliadas em indivíduos obesos submetidos à cirurgia bariátrica. Variações no gene *ADIPOQ* foram preditoras de melhora no perfil lipídico pós-cirúrgico. Indivíduos homocigotos para o alelo C do SNP *ADIPOQ* -11377 apresentaram maior redução de colesterol total, LDL e triglicérides quando comparados aos portadores do alelo G. Além disso, nas combinações haplotípicas, os portadores do haplótipo A-C apresentaram maior variação de colesterol LDL quando comparados aos portadores do haplótipo G-G.

Considerando a complexidade das vias de regulação dos microRNAs, da influência de variações nas regiões promotoras de genes e da perda de peso na melhora do perfil metabólico, os resultados aqui apresentados precisam ser explorados e validados por outros estudos. Devido ao aumento da prevalência da obesidade se apresentar como fator crítico para as políticas públicas de saúde, técnicas inovadoras de compreensão dos mecanismos moleculares inerentes a essa patologia são imprescindíveis. Assim, os microRNAs surgem como possíveis

marcadores prognósticos que devem ser usados sinergicamente com o conhecimento de variantes genéticas e com outros tratamentos para mitigar a obesidade e os distúrbios associados. Além disso, sabe-se que muitos fármacos e tratamentos já levam em conta variações gênicas específicas, as quais auxiliam o ajuste de doses terapêuticas e a diminuição de efeitos adversos relacionados. Logo, a melhor compreensão do papel de variantes, principalmente as localizadas em regiões chave do gene, associadas ao fenótipo obeso também deverá ajudar no tratamento e nos cuidados pós-cirúrgico, gerando maior qualidade de vida aos pacientes.

Anexo I – Aprovação no CEP da UFCSPA

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Análise da expressão de genes de adiponectinas no tecido de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica	
Pesquisador Responsável Vanessa Mattevi Parecer 1347/11	
Data da Versão 25/03/2011	Cadastro 772/11
Data do Parecer 28/04/2011	
Grupo e Área Temática	Classificação utilizada pela CONEP
Objetivos do Projeto Verificar os níveis de expressão do RNAm dos genes de leptina, adiponectina e resisitina e outras adiponectinas no tecido adiposo subcutâneo e visceral de indivíduos obesos Avaliar o efeito da presença de diferentes polimorfismos nas regiões regulatórias dos respectivos genes sobre expressão de adipocinas Correlacionar a presença de polimorfismos investigados com características antropométricas e metabólicas dos pacientes investigados	
Sumário do Projeto estudo observacional, descritivo transversal realizado com indivíduos obesos mórbidos submetidos à cirurgia Bariátrica no Serviço de Atenção ao Obeso Classe III do Hospital Nossa Senhora Conceição. Serão avaliadas variáveis antropométricas e bioquímicas, junto aos prontuários dos pacientes. durante o procedimento cirurgico serão coletadas amostras de sangue para caracterização dos polimorfismos de interesse e ainda amostras de gordura visceral e subcutânea para comparação de expressão gênica nos diferentes polimorfismos encontrados.	
Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas
Comentários sobre os itens de identificação	
Introdução	Adequada
Comentários sobre a Introdução	
Adequada e bem referenciada	
Objetivos	Adequados
Comentários sobre os Objetivos	
Os objetivos estão adequados.	
Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado *
Tamanho de amostra	Total 80 Local
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Não se aplica
Crterios de inclusão e exclusão	Ausentes
Relação risco- benefício	Não apresentada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Não se aplica
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Ausente
Termo de Consentimento	Não necessário

Adequação às Normas e Diretrizes	Não
Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos	
Cronograma	Ausente
Data de início prevista	05/2011
Data de término prevista	02/2013
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Agência de fomento
Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento	
a	
Referências Bibliográficas	Adequadas
Comentários sobre as Referências Bibliográficas	

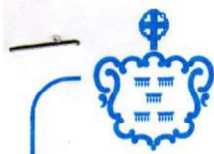
Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Sugiro incluir critério de exclusão: idade inferior a 18 anos
--

Anexo II – Aprovação no CEP da ISCMPA



Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Rua Prof. Annes Dias, 295 – Telefone: (51) 3214.8080 – Fax: (51) 3214.8585
 CEP 90020-090 – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – CNPJ: 92815000/0001-68
 Site: www.santacasa.org.br – E-mail: marketing@santacasa.tche.br



PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer nº 481/11

Protocolo nº 3662/11

Título: “Investigação de microRNAs de genes-alvo envolvidos nos processos angiogênico inflamatório e metabólico do tecido adiposo”.

Pesquisador Responsável: Vanessa Suñé Mattevi

Instituição onde se realizará – Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Data de Entrada: 16/11/2011

II – Objetivos – Geral: Investigar o padrão de expressão de microRNAs que tenham por alvo genes envolvidos tanto nos processos inflamatório e angiogênico, quanto relacionados ao perfil metabólico em tecido adiposo subcutâneo de indivíduos submetidos à cirurgia plástica estética abdominal.

Específicos: 1. Implantar metodologias laboratoriais para análise de microRNAs pela transcrição reversa e reação de polimerase em tempo real;

2. Verificar a expressão microRNAs de interesse no tecido adiposo e correlacionar os níveis de expressão com o índice de massa corporal dos indivíduos recrutados;

3. Sequenciar a região 3°UTR de genes envolvidos para confirmar alvo;

4. Comparar níveis adipocinais plasmáticas com a expressão dos respectivos microRNAs regulatórios.

III - Sumário do Projeto

Descrição e caracterização da amostra: Será conduzido um estudo transversal para avaliar o padrão de microRNAs no tecido adiposo em pacientes submetidos à cirurgia plástica na região abdominal com fins estéticos.

Critérios de inclusão: Idade igual ou superior a 18 anos.

Critérios de exclusão: • Doença neurológica que impeça o pacientes de entender o estudo;

- Doença inflamatória crônica;
- Gravidez.

Adequação das condições - Hospital escola com infra-estrutura adequada para a realização do estudo descrito

IV - Comentários:

- **Justificativa do uso de placebo** – Não se aplica.

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/ISCMPA Fone/Fax (51) 3214-8571 – e-mail: cep@santacasa.tche.br
 Reconhecido: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP / Ministério da Saúde
 IRB – Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)
 Office for Human Research Protections (ORPH) sob número - IRB00002509.
 FWA – Federalwide Assurance sob número - FWA00002949.



Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Rua Prof. Annes Dias, 295 – Telefone: (51) 3214.8080 – Fax: (51) 3214.8585
 CEP 90020-090 – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – CNPJ: 92815000/0001-68
 Site: www.santacasa.org.br – E-mail: marketing@santacasa.tche.br



- **Análise de riscos e benefícios** – Os riscos apontados no projeto são o da colheita de 5mL sangue e de um pequeno fragmento de gordura (100mg) durante o processo cirúrgico.

Os benefícios previstos são investigar o padrão de expressão de microRNAs que tenham por alvo genes envolvidos tanto nos processos inflamatório e angiogênico, quanto os relacionados ao perfil metabólico em tecido adiposo subcutâneo e implantar metodologias laboratoriais para análise de microRNAs pela transcrição reversa e reação de polimerase em tempo real;

- **Adequação do termo de consentimento e forma de obtê-lo** – O termo de consentimento é claro e completo, consideramos adequado. Há declaração de uso exclusivo para as finalidades descritas no protocolo dos dados e materiais biológicos, firmada pela Pesquisadora Responsável e pelos cinco Co-investigadores.

- **Informação adequada quanto ao financiamento** – O orçamento do presente estudo, que será realizado no Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA, totaliza R\$ 19.951,95 e é informado que serão solicitados recursos adicionais às agências de fomento, no decorrer do projeto. Há declaração da Pesquisadora Responsável, Dra. Vanessa Suñé Mattevi, de que o projeto não acarretará nem um ônus à ISCMPA.

- **Outros centros no caso de estudos multicêntricos** – Não se aplica.

V - Parecer do Relator - “Após avaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer”.

VI - Data da Reunião: 06/12/2011.

“Projeto e Termo de Consentimento, Aprovados”.

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 – Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

Porto Alegre, 14 de Dezembro de 2011.

Prof.Dr. Cláudio Telöken
Coordenador do CEP/ISCMPA

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/ISCMPA
 Reconhecido:

Fone/Fax (51) 3214-8571 – e-mail: cep@santacasa.tche.br
 Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP / Ministério da Saúde
 IRB – Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)
 Office for Human Research Protections (ORPH) sob número - IRB00002509.
 FWA – Federalwide Assurance sob número - FWA00002949.

Parecer 481/11

Anexo III – Aprovação no CEP do GHC



HOSPITAL N. S. DA CONCEIÇÃO S.A.
Av. Francisco Trein, 566
CEP 91350-205 - Porto Alegre - RS
Fone: 3357 2000
CNPJ: 92.787.118/0001-20

HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO
(Unidade Pediátrica do Hospital Nossa
Senhora da Conceição S.A.)

HOSPITAL CRISTO REDENTOR S.A.
Rua Domingos Rubbe, 20
CEP 91040-000 - Porto Alegre - RS
Fone: 3357 4100
CNPJ: 92.787.126/0001-75

HOSPITAL FEMINA S.A.
Rua Mostardeiro, 17
CEP 91420-001 - Porto Alegre - RS
Fone: 3314 5200
CNPJ: 92.693.134/0001-53



Vinculados ao Ministério da Saúde - Decreto nº 93.244/90

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/GHC

O Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP/GHC), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS desde 31/10/1997, pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0001105) e pelo FWA - Federalwide Assurance (FWA 00000378) em reunião extraordinária realizada em 27 de julho de 2011, reavaliou-o seguinte projeto:

Projeto: 11-105

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

MAURÍCIO JACQUES RAMOS
NELSON GUARDIOLA MEINHARDT
DIEGO OLSCHOWSKY BORGES
VANESSA SUNÉ MATTEVI

Título: Análise da expressão de genes de adipocinas no tecido adiposo de pacientes submetidos a cirurgia bariátrica

Documentação: Aprovados
Aspectos Metodológicos: Aprovados
Aspectos Éticos: Aprovados

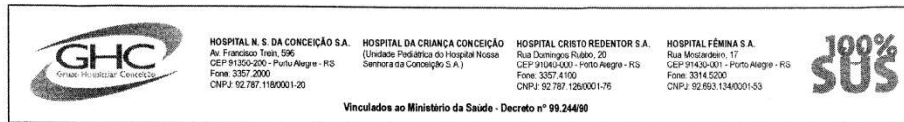
Parecer final: Este projeto, bem como os documentos adicionais incluindo o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por estar de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, obteve o parecer de APROVADO, neste CEP.

Considerações Finais: Toda e qualquer alteração do projeto, deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/GHC, bem como os Eventos Adversos ocorridos. O Pesquisador compromete-se a encaminhar dentro dos prazos estipulados, o(s) relatório(s) parcial(ais) e final ao Comitê de ética em Pesquisa do GHC.

Porto Alegre, 27 de julho de 2011.

Daniel Demétrio Faustino da Silva
Coordenador-geral do CEP/GHC

Anexo IV – Aprovação de adendo submetido ao CEP do GHC



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO CEP – GHC

CEP-GHC/015-13

Porto Alegre, 18 de abril de 2013.

De: Comitê de Ética em Pesquisa do GHC
Para: Vanessa Suñe Mattevi

Assunto: Adendo ao projeto
Ref.: Projeto de pesquisa nº 11-105 - Análise da expressão de genes de adipocinas no tecido adiposo de pacientes submetidos a cirurgia bariátrica.

Prezada pesquisadora,

Em resposta ao adendo ao projeto supracitado, informamos que as alterações foram analisadas e aceitas por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Salientamos da importância do encaminhamento do(s) relatório(s) parcial(is) que até o presente momento não foi encaminhado.

Sem mais, atentamente,

Daniel Demétrio Faustino da Silva
Coordenador-geral do CEP – GHC

Comitê de Ética em Pesquisa do HNSC/GHC fone/fax: (51) 3357-2407 - e-mail: pesquisas-gep.@ghc.com.br
Reconhecido: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP (31/out/1997) - Ministério da Saúde
IRB - Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)
Office for Human Research Protections (ORPH) sob número - IRB 00001105
FWA Federalwide Assurance sob número FWA 00000378