

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

Patrícia Lavandoski

**ATIVAÇÃO DA VIA AGE-RAGE E SUA INTERAÇÃO COM MICRORNAS  
PROPOSTOS COMO REGULADORES-CHAVE DA IMUNOSSENESCÊNCIA NO  
CONTEXTO DA OBESIDADE**

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Lavandoski, Patrícia  
ATIVACÃO DA VIA AGE-RAGE E SUA INTERAÇÃO COM  
MICRORNAs PROPOSTOS COMO REGULADORES-CHAVE DA  
IMUNOSSENESCÊNCIA NO CONTEXTO DA OBESIDADE / Patrícia  
Lavandoski. -- 2019.  
98 f.

Orientadora: Florencia Maria Barbé-Tuana.

Coorientadora: Fátima Theresinha Costa Rodrigues  
Guma.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. MicroRNA. 2. Obesidade. 3. Imunossenescência. 4.  
PEMC. I. Maria Barbé-Tuana, Florencia, orient. II.  
Theresinha Costa Rodrigues Guma, Fátima, coorient.  
III. Título.

Patrícia Lavandoski

**ATIVACÃO DA VIA AGE-RAGE E SUA INTERAÇÃO COM MICRORNAS  
PROPOSTOS COMO REGULADORES-CHAVE DA IMUNOSSENESCÊNCIA NO  
CONTEXTO DA OBESIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Bioquímica.

Orientador(a): Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Florencia María Barbé-Tuana  
Coorientador(a): Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma

Porto Alegre

2019

**PATRÍCIA LAVANDOSKI**

**ATIVACÃO DA VIA AGE-RAGE E SUA INTERAÇÃO COM MICRORNAS  
PROPOSTOS COMO REGULADORES-CHAVE DA IMUNOSSENESCÊNCIA NO  
CONTEXTO DA OBESIDADE**

Dissertação aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ para obtenção do título de Mestra em Bioquímica  
pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BANCA EXAMINADORA:

---

Dr. Juciano Gasparotto (Pós-doutorando do PPG Bioquímica/UFRGS)

---

Prof. Dr. Jose Carlos Merino Mombach (Professor permanente do PPG Física/ UFSM)

---

Prof. Dr. Fábio Klamt (Professor permanente do PPG Bioquímica e relator)

Porto Alegre

2019

## AGRADECIMENTOS

Sou profundamente grata a todos que me auxiliaram durante o desenvolvimento deste trabalho, seja através de ensinamentos ou palavras de incentivo.

Primeiramente quero agradecer os principais responsáveis por eu poder estar vivendo essa experiência hoje, meus pais Oneida e Nadir, que desde sempre enfatizaram a importância dos estudos e que, para que eu pudesse sair de casa em busca de aprendizado, colocaram seus sonhos em pausa em prol dos meus. Agradeço muito pelos valores ético e moral que sempre enfatizaram ao longo do meu desenvolvimento e que carreguei comigo ao longo da construção dessa dissertação e carregarei ao de toda a minha vida acadêmica e além. Eu nunca poderei agradecer o suficiente por tudo o que fizeram e fazem por mim e, sinceramente, espero um dia poder retribuir uma pequena parte de tudo isso. Agradeço também meu irmão Gabriel, que constantemente me inspira a me tornar uma pessoa melhor para me tornar o exemplo que ele (estranhamente) acredita que sou. Igualmente agradeço a Gabriele, da qual eu tenho o maior orgulho de ser madrinha. Fui escolhida como guia, mas jamais poderia pretender ensinar para ela o que ela me ensina e demonstra sobre afetos e empatia. Obrigada Simone, minha irmã de aluguel, uma mulher decidida e fonte inesgotável de carinho, cuja história de vida e conquistas eu admiro imensamente. Amo todos vocês.

Sou extremamente grata pela oportunidade de aprender as mais diversas qualidades e habilidades sob a orientação da Professora Dr<sup>a</sup> Florencia M. Barbé-Tuana, cuja conduta ética, competência e empolgação pela ciência e pelo novo admiro enormemente. Obrigada pela confiança e por ter abraçado comigo uma linha completamente nova e por ter me guiado nas inúmeras descobertas e aprendizados que constituíram essa dissertação. E parafraseando o TCC: obrigada por ter lidado com minhas inseguranças com uma calma estoica e bom humor.

Serei eternamente grata a professora Dra. Fátima, coorientadora deste trabalho, que abriu as portas da pesquisa na minha vida quando me aceitou como aluna de iniciação científica e da sua sala de aula me permitindo descobrir minha paixão pela educação e pela divulgação científica. E devo apontar que o fato de nosso laboratório ser um dos melhores espaços para se conviver e aprender não é uma coincidência, mas um reflexo de quem tu és como pessoa e da paciência e respeito com que lida com tudo e todos.

Agradeço as minhas colegas e meus colegas do laboratório 21, com quem passei horas a fio discutindo paradigmas científicos, pseudociências, nosso papel social e os propósitos ou não-propósitos da experimentação científica, temas tão relevantes para a minha formação quanto os demais processos que envolveu o meu mestrado acadêmico.

Um agradecimento especial para o Telogroup, construído pela professora Florência baseado em um tema de pesquisa extremamente relevante e encantador, mas que acabou por me apresentar pessoas pelas quais guardo um carinho incalculável e cujas amizades espero carregar comigo pelo resto da vida: admiro todos vocês pessoal e profissionalmente, profundamente. Obrigada Mari Parisi que foi quem inicialmente me adotou há muito tempo atrás e uma das mentes coisas mais fenomenais que já tive a oportunidade de conhecer. Saudades das nossas noites de Imperial e risadas, o laboratório sente tua falta. Obrigada Lucas Grun pela paciência infindável e por sempre estar aberto a responder minhas dúvidas e por me consolar nos momentos de desespero (que não foram poucos nesses dois anos, sinto muito). Tu és um ótimo colega e amigo (e colega de apartamento!). Obrigada Cari, que chegou há tão pouco tempo e em sua dedicação exemplar se fez essencial ao me acompanhar em experimentação em pleno sábado de madrugada. Finalmente, obrigada Vinícius Pierdoná, Vini, meu colega e companheiro, que me acolhe em minhas inseguranças e me faz sempre querer ser uma pessoa melhor. Posso dizer com toda a certeza de que essa dissertação não teria sido a

mesma sem tu ao meu lado, me confortando, me incentivando, me dando ideias e apoio. Obrigada por tudo.

Agradeço a todos meus amigos fora do laboratório, cuja amizade negligenciei nos últimos tempos, mas pela qual sou extremamente grata e guardarei comigo sempre: Amanda, Meline e Daiana.

Obrigada ainda ao Dr. do PPG Bioquímica Mauro Mozael Hirsch pela paciência e dedicação com que me ajudou durante o processo de padronização da técnica de microRNAs e por todo o aprendizado que me proporcionou.

Finalmente agradeço imensamente os membros da banca examinadora, Prof. Dr. Fábio Klamt, ao Prof. Dr. Jose Carlos Merino Mombach e ao Dr. Juciano Gasparotto, pelo interesse e disponibilidade em avaliar esse trabalho.

Agradecimentos especiais a UFRGS pela estrutura que permitiu o acesso a um mestrado acadêmico e a PUCRS pelas colaborações e a Pro-Pesq e órgãos de pesquisa CAPES, CNPq, pelos recursos que permitiram a execução desse trabalho e a minha formação. Qualquer ameaça a órgãos tão essenciais como esses para o enriquecimento científico de um país significa um retrocesso imenso.

## Sumário

PARTE I.....	1
RESUMO .....	2
LISTA DE ABREVIATURAS .....	4
1. INTRODUÇÃO .....	7
1.1. Obesidade.....	7
1.2. <i>Inflamm-aging</i> e imunossenescência.....	8
1.3. <i>Inflamm-aging</i> e imunossenescência na obesidade .....	11
1.4. MicroRNAs no contexto regulatório.....	12
1.5. Papel dos microRNAs da indução do fenótipo imunossenescente.....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS .....	19
3.1. Objetivo geral.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
PARTE II .....	20
4. CAPÍTULO I: MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
4.1. População do estudo:.....	21
4.1.1. Aspectos éticos.....	21
4.1.2. Critérios de inclusão.....	22
4.1.3. Coleta do material biológico .....	22
4.2. Microarranjos e Análise de Expressão Diferencial .....	23
4.3. Análise Ontológica.....	23
4.4. Busca por microRNAs reguladores.....	24
4.5. Análise de Enriquecimento de Via.....	25
4.6. Desenho de oligonucleotídeos iniciadores específicos.....	26
4.7. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	29
4.8. Análise de expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)	
30	
4.9. Citometria de fluxo.....	31
4.10. Tratamento de resíduos químicos e biológicos .....	31
4.11. Análises estatísticas.....	32
5. CAPÍTULO II: RESULTADOS .....	33
5.1. Dados demográficos das populações em estudo .....	33

5.2.	Busca por microRNAs em microarranjos para PBMC de indivíduos portadores de obesidade	34
5.3.	Genes associados a “inflammatory response” e “aging” .....	35
5.4.	MicroRNAs reguladores dos fenótipos imunossenescência ou <i>Inflamm-aging</i> .....	36
5.5.	Papel central da via AGE-RAGE no fenótipo <i>Inflamm-aging</i> .....	38
5.6.	Regulação transcricional da via AGE-RAGE .....	40
5.7.	Expressão aumentada de RAGE em pacientes portadores de obesidade .....	41
5.8.	Redução da viabilidade celular e aumento no número de monócitos em pacientes com obesidade.....	45
5.9.	Padronização da detecção de microRNAs por qRT-PCR .....	46
5.10.	Seleção de controle endógeno para microRNAs.....	49
5.11.	Alterações no perfil de microRNAs em PBMC de indivíduos com obesidade.....	51
6.	DISCUSSÃO.....	52
7.	PERSPECTIVAS .....	65
8.	REFERÊNCIAS .....	67
9.	LISTA DE FIGURAS .....	78
10.	LISTA DE TABELAS .....	80
11.	MATERIAL SUPLEMENTAR .....	81
12.	ANEXOS.....	85
12.1.	Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	85
12.2.	Anexo 2 – Parecer aprovado pelo CEP da UFRGS.....	89
12.3.	Anexo 3 – Parecer aprovado pelo CEP da PUCRS.....	91
12.4.	Anexo 4 – QR Code e link de acesso para o navegador para a rede de interações contendo 8 microRNAs propostos como nodos centrais para os fenótipos imunossenescente e <i>inflamm-aging</i> , bem como dos 39 genes por eles regulados. ....	93
12.5.	Anexo 5 - QR Code e link de acesso para o navegador para a via de sinalização AGE-RAGE adaptada a partir da base de dados <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> (KEEG) com destaque à direita para os 8 microRNAs-chave , juntamente com seus respectivos alvos proteicos (destacados também em azul na via). ....	94

# **PARTE I**

## RESUMO

**Introdução:** A imunossenescência é caracterizada por um status pró-inflamatório sistêmico crônico e pela redução da capacidade celular de lidar com stress, características comumente presentes no envelhecimento fisiológico e também na obesidade. O perfil pró-inflamatório sistêmico observado na obesidade tem relação com a indução de senescência em células saudáveis, porém, os mecanismos envolvidos no estabelecimento desse fenótipo ainda não são bem compreendidos. **Objetivo:** Investigar mecanismos envolvidos no estabelecimento da imunossenescência em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes portadores de obesidade, analisando uma rede de interação contendo proteínas e microRNAs importantes para este fenótipo. **Metodologia e resultados:** Inicialmente, foi realizada a construção de uma lista de genes relacionados à imunossenescência a partir da intersecção entre os termos ontológicos “*inflammatory response*” e “*aging*” obtidos a partir da base de dados Gene Ontology, onde foram encontrados 39 genes envolvidos simultaneamente com ambos os termos. Então, passamos a investigar os microRNAs capazes de regular por complementariedade os genes envolvidos na imunossenescência em 8 bases de dados diferentes. A partir dessa lista foram selecionados como nodos centrais para a regulação da rede os microRNAs realizando 18 ou mais interações com os genes envolvidos no fenótipo imunossenescente para posterior validação: hsa-miR-214-3p, hsa-miR-3163, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-374b-5p, hsa-miR-495-3p, hsa-miR-520f, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-548-3p. Foi realizada ainda uma análise de enriquecimento de via utilizando o software ConsensusPathDB para os 39 genes envolvidos na imunossenescência, onde a via de sinalização AGE-RAGE se mostrou a mais enriquecida ( $P = 1,14e-12$ ). A validação desses dados via qRT-PCR em PBMC de pacientes portadores de obesidade e controles eutróficos demonstrou uma redução na expressão de miR-374-5p ( $P = 0,0386$ ) e similaridade na expressão de miR-214-3p entre os grupos. Ao analisarmos componentes da via AGE-RAGE em PBMC de pacientes portadores de obesidade, observamos um aumento significativo na expressão proteica de RAGE ( $P = 0,0075$ ), na expressão gênica de STAT3 ( $P = 0,0369$ ) e na fosforilação de NFkB ( $P = 0,0052$ ) e p38 ( $P < 0,0001$ ). **Conclusões:** As análises de bioinformática apontaram para 8 microRNAs centrais na regulação da imunossenescência e para via AGE-RAGE como a mais enriquecida nesse fenótipo. Proteínas e microRNAs indicados pelas análises de bioinformática como relevantes na regulação da imunossenescência estavam de fato alterados em PBMC de pacientes portadores de obesidade, demonstrando a capacidade do nosso modelo *in silico* de prever fenômenos biológicos relevantes (CAAE: 26793114.0.0000.5347).

## ABSTRACT

**Introduction:** Immunosenescence is characterized by an increased systemic proinflammatory status and by a compromised capacity of the cell to cope with stress, features commonly associated with physiological aging and also with obesity. The systemic proinflammatory observed in obesity is related to senescence induction in healthy cells, however, the mechanisms involved in this phenotype establishment are not yet understood. Thus, the **aim** of this work is to investigate the mechanisms involved on the immunosenescence establishment on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from obese patients, analyzing a network containing proteins and microRNAs relevant for this phenotype. **Methods and results:** First, it was built a list containing genes related to immunosenescence from the intersection between the ontological terms “inflammatory response” and “aging”, acquired from the database Gene Ontology, were we found 39 genes involved simultaneously with both terms. Then we started to investigate microRNAs capable of regulating by complementarity those genes involved on immunosenescence in 8 different databases. From that list, were selected as central regulatory nodes the microRNAs performing at least 18 interactions with genes involved on the immunosenescent phenotype for posterior validation: hsa-miR-214-3p, hsa-miR-3163, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-374b-5p, hsa-miR-495-3p, hsa-miR-520f, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-548-3p. It was performed also an enrichment pathway analysis through ConsensusPathDB software for the 39 genes involved on immunosenescence, were the most enriched signaling pathway was AGE-RAGE ( $P = 1.14e-12$ ). Data validation via qRT-PCR in PBMC from obese patients and eutrophic controls showed a reduction on miR-374-5p expression ( $P = 0.0386$ ) and similar expression for miR-214-3p between groups. When we analyzed the AGE-RAGE pathway components, we observed an increased protein expression of RAGE ( $P = 0.0075$ ), on gene expression of STAT3 ( $P = 0.0369$ ) and also in NFkB ( $P = 0.0052$ ) and P38 ( $P < 0.0001$ ) phosphorylation in PBMC from patients with obesity. **Conclusions:** Bioinformatics pointed out 8 central microRNAs for immunosenescence regulation and the AGE-RAGE as the more enriched pathway in this phenotype. Proteins and microRNAs proposed by bioinformatic analyses as relevant for immunosenescence regulation were in fact altered in PBMC from patients with obesity, demonstrating the efficiency of our *in silico* model in predicting relevant biological phenomena (CAAE: 26793114.0.0000.5347).

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADA - Adenosina deaminase

AGE – do inglês *Advanced glycation end products*

AGT - Angiotensinogênio

AKT1 – do inglês *V-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*

APOD - do inglês *Apolipoprotein D*

AS – Apneia do sono

B3GAT1 – do inglês *Beta-1,3-Glucuronyltransferase 1*

BCL10, 7, 11, 11B, 6, 8, 9 – do inglês *B-cell lymphoma/leukemia 10, 7, 11, 11B, 6, 8, 9*

CALCA - do inglês *Calcitonin Related Polypeptide Alpha*

CCL13 - do inglês *C-C motif chemokine ligand 13*

CGTRQ - Central de gerenciamento e tratamento de rejeitos químicos

CNR1 - do inglês *Cannabinoid receptor 1*

Cosmc - do inglês *Core 1  $\beta$ GalT-specific molecular chaperone*

COX-2 - Ciclo-oxigenase-2

CVD - Doenças cardiovasculares

DAMP - do inglês *Damage-associated molecular patterns*

DIS - Dislipidemia

DM2 - diabetes mellitus tipo 2

EDNRB – do inglês *Endothelin receptor type B*

EPO - Eritropoietina

FOS - do inglês *Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit*

GEO - do inglês *Gene expression omnibus*

GNB2L1 - do inglês *Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like*

H2AFX – do inglês *H2A histone family member X*

HAMP – do inglês *Hepcidin antimicrobial peptide*

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

HFD – do inglês *High Fat Diet*

HYAL – do inglês *Hyaluronidase*

HYLA – do inglês *Extracellular hyaluronidase*

ICAM1 – do inglês *Intercellular adhesion molecule 1*

IL – Interleucina

IMC – Índice de massa corporal

INF – Interferon

*IRAK1* – do inglês *Interleukin 1 receptor associated kinase 1*

*ITGB2* – do inglês *Integrin subunit beta 2*

*IκBα* – do inglês *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*

KEEG – do inglês *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*

*KIR2DL4* – do inglês *Killer cell immunoglobulin like receptor, two ig domains and long cytoplasmic tail 4*

*KLRG1* – do inglês *Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1*

LPS - Lipopolissacarídeo

MAPK – do inglês *Mitogen-activated protein kinase*

*MAPK14* – do inglês *Mitogen-activated protein kinase 14*

MFI – do inglês *Median fluorescence intensity*

MiR – MicroRNA

mTOR – do inglês *Mammalian target of rapamycin*

*NFE2L2* – do inglês *Nuclear factor, erythroid 2 like 2*

NF-κB – do inglês *Nuclear factor kappa B*

NK – do inglês *Natural killer cells*

*NOX4* – do inglês *NADPH oxidase 4*

*NPY5R* – do inglês *Neuropeptide Y receptor Y5*

nt - Nucleotídeos

*OGG1* – do inglês *8-Oxoguanine DNA Glycosylase*

*PBMC* – do inglês *Peripheral blood mononuclear cells*

*PDCD4* ou *PCD4* – do inglês *Programmed cell death 4*

PI3K – do inglês *Phosphoinositide 3-kinases*

PMA – do inglês *Phorbol 12-myristate 13-acetate*

*POLB* – do inglês *DNA polymerase beta*

*PRKCD* – do inglês *Protein kinase C delta*

*PTEN* – do inglês *Phosphatase and tensin homolog*

*PTGS2* – do inglês *Prostaglandin-endoperoxide synthase 2*

qRT-PCR – do inglês *Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*

RAGE – do inglês *Receptor for advanced glycation end products*

*RELA* – do inglês *RELA proto-oncogene, NF-κB subunit*

ROS – do inglês *Reactive oxygen species*

SASP – do inglês *Senescence-associated secretory phenotype*

*SERPINE1* – do inglês *Serpin family e member 1*

SFB - Soro fetal bovino

SM – Síndrome metabólica

*SOX4* – do inglês *SRY-related HMG box transcription factor 4*

*STAT3* – do inglês *Signal transducer and activator of transcription 3*

T-ALL – do inglês *T-cell acute lymphoblastic leukaemia*

TCR – do inglês *T cell receptor*

TGF- $\beta$  – do inglês *Transforming growth factor beta*

Th1 – do inglês *Type 1 T helper cells*

TLR – do inglês *Toll-like receptor*

*TNFRSF1B* - do inglês *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B*

TNF- $\alpha$  – do inglês *Tumor necrosis factor alpha*

*TRAF6* – do inglês *Tumor necrosis factor receptor associated factor 6*

TReg – do inglês *Regulatory T cells*

*VCAM-1* – do inglês *Vascular cell adhesion molecule 1*

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Obesidade

A obesidade é uma doença crônica não transmissível caracterizada primariamente pelo excesso de gordura corporal, considerada pela Organização Mundial da Saúde um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, com projeções apontando uma prevalência de 700 milhões de indivíduos adultos obesos e 2,3 bilhões com sobrepeso até 2025 (WHO, 2011).

A expansão exacerbada do tecido adiposo, observada em indivíduos portadores de obesidade, acaba por induzir um aumento no número de processos de morte celular como necrose, apoptose e piroptose, o que leva ao extravasamento de padrões moleculares associados a dano (DAMP), induzindo o recrutamento de células do sistema imune inato, como macrófagos. Uma vez infiltrados no tecido adiposo, esses macrófagos secretam sinais quimiotáticos e citocinas pró-inflamatórias capazes de recrutar células do sistema imune adaptativo, além de estimular sua proliferação e polarização para um perfil pró-inflamatório. (GRANT; DIXIT, 2015)

Como consequência desse cenário de retroalimentação positiva de ativação imune, a obesidade - assim como outras patologias e durante o envelhecimento - é marcada por um desbalanço pró-inflamatório, estimulado pela indução da diferenciação de macrófagos para um perfil mais pró-inflamatório (M1) e pelo aumento da proliferação e polarização de linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1) (GRANT; DIXIT, 2015).

Devido à grande infiltração e ativação de células do sistema imune no tecido adiposo, juntamente com o aumento na secreção de moléculas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ) e interferon (INF), o tecido adiposo vem sendo investigado e descrito como um órgão imune. Interessantemente, a influência do tecido adiposo enquanto órgão imune é drasticamente reduzida em indivíduos não-obesos, que além de

apresentarem um menor número de células do sistema imune no tecido adiposo, têm um predomínio de macrófagos com um perfil anti-inflamatório (M2) e de linfócitos T efetores com capacidade regulatória (Treg) (GRANT; DIXIT, 2015).

Entretanto, o estado pró-inflamatório presente na obesidade é reversível. Um estudo realizado por Canello, et al (2005) demonstra que apenas três meses após cirurgia bariátrica realizada em pacientes portadores de obesidade foram suficientes para direcionar a polarização de macrófagos para seu perfil anti-inflamatório (M2) (CANCELLO et al., 2005).

### **1.2. *Inflamm-aging* e imunossenescência**

O termo *inflamm-aging* foi cunhado em 2000, por Franceschi e colaboradores, afim de descrever a redução da capacidade celular de lidar com estresses com concomitante aumento do status pró-inflamatório crônico, estéril, sistêmico e de baixo grau associados ao avanço da idade (FRANCESCHI et al., 2000).

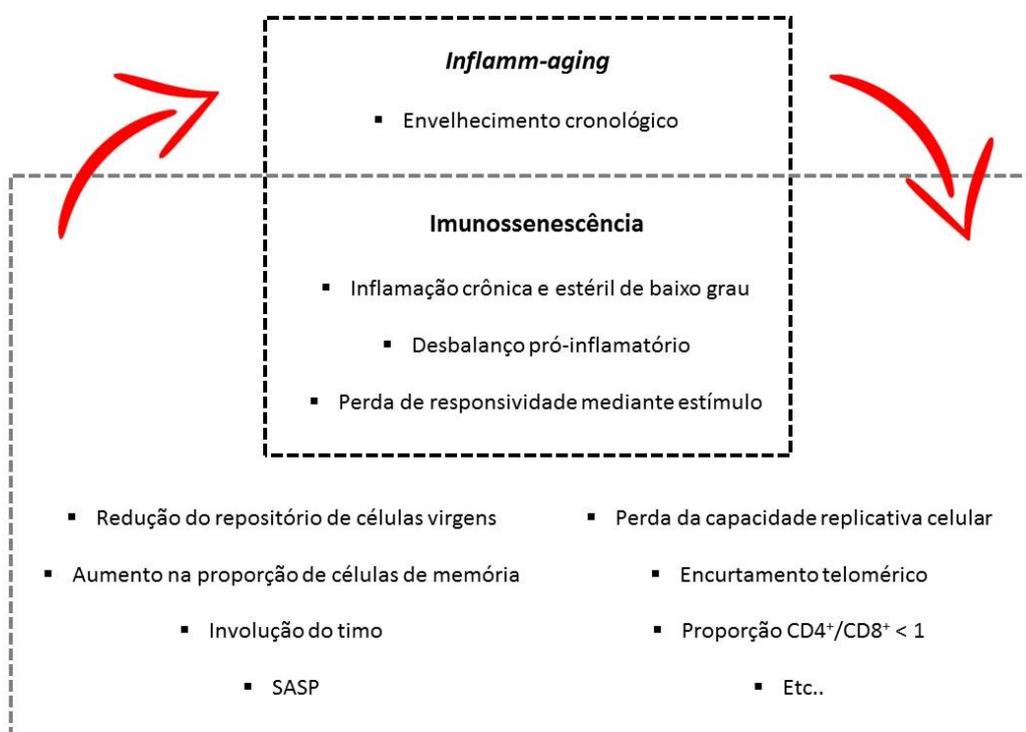
Esse estado é causado pelo contínuo estímulo do sistema imune inato contra o não-próprio (infecções persistentes), próprio (restos celulares, proteínas próprias, compostos glicosados, entre outros), quase-próprio (principalmente pela microbiota intestinal) e pelo acúmulo de células senescentes com um perfil de secreção pró-inflamatório (FULOP et al., 2017).

Embora o processo de estabelecimento do status pró-inflamatório crônico que caracteriza o *inflamm-aging* ainda não seja bem compreendido, a literatura tem sugerido que ele se dá majoritariamente pela ampliação do fenótipo imunossenesciente durante o envelhecimento (FULOP et al., 2017).

O termo imunossenescência define uma série de alterações celulares que ocorrem no sistema imune com o avanço da idade, como a involução do timo, perda de responsividade celular diante de estímulo, perda da capacidade replicativa e aumento da secreção de citocinas

pró-inflamatórias e outras moléculas que juntas compõe o fenótipo secretor associado à senescência (SASP) (DE LA FUENTE; M. DE CASTRO, 2012).

Juntos, esses dois fenótipos complementares vem sendo propostos como os grandes responsáveis pelo aumento da incidência de doenças pró-inflamatórias presentes no envelhecimento como Alzheimer, doença pulmonar obstrutiva crônica, artrite reumatoide, Parkinson, sarcopenia (FRANCESCHI et al., 2018) e ainda pela menor responsividade a vacinas e aumento da incidência de tumores em idade avançada (FULOP et al., 2017).



**Figura 1. Caracterização dos fenótipos *inflamm-aging* e imunossenescência, sugerindo uma retroalimentação positiva e sobreposição entre ambos.**

Porém, ainda não existe na literatura uma definição consensual para o fenótipo imunossenesciente, o que dificulta a compreensão e estudo dos mecanismos moleculares envolvidos em seu estabelecimento a nível celular ou sistêmico.

Entre os diversos marcadores descritos na literatura estão: status proliferativo, comprimento telomérico, níveis totais de espécies reativas de oxigênio (ROS), potencial de membrana mitocondrial reduzido, aumento de secreção de citocinas com perfil pró-inflamatório e metaloproteinases de degradação de matriz extracelular, propostos como componentes do SASP (SHARPLESS; SHERR, 2015; XU; LARBI, 2017).

Tratando-se de células do sistema imune, a heterogeneidade de marcadores reflete a diversidade celular, incluindo ainda, para linfócitos T, a redução na expressão da molécula coestimulatória de superfície CD28 e o aumento na expressão das moléculas de superfície *B3GAT1* (*Beta-1,3-Glucuronyltransferase 1*) e *KLRG1* (*Killer Cell Lectin Like Receptor G1*), associadas com comprometimento da capacidade proliferativa de linfócitos T e células assassinas naturais (NK) (XU; LARBI, 2017).

Estão ainda descritos como marcadores a ativação da proteína *Killer cell immunoglobulin like receptor, two ig domains and long cytoplasmic tail 4* (*KIR2DL4* ou *CD158D*) em células NK (ONG et al., 2018), a alteração da proporção das populações celulares, como a redução de linfócitos T virgens ( $CD44^{\text{baixo}}CD62L^{\text{alta}}$ ) ou a inversão da relação entre linfócitos T auxiliares e citotóxicos,  $CD4^+$  e  $CD8^+$ , respectivamente ( $CD4:CD8 < 1$ ) (OISHI; MANABE, 2016), etc.

A lista crescente de marcadores ainda inclui alguns microRNAs (miR), como o miR-146a em macrófagos, cuja expressão está até seis vezes aumentada em indivíduos em idade avançada (JIANG et al., 2012).

Porém, existem ao menos duas características recorrentes em trabalhos abordando a imunossenescência e que curiosamente formam um paralelo com a definição original do *inflamm-aging*: sua associação com o envelhecimento cronológico e com um status pró-inflamatório crônico, estéril, sistêmico e de baixo grau.

### **1.3. *Inflamm-aging* e imunossenescência na obesidade**

Em termos gerais, o envelhecimento está associado a um estado de inflamação crônica sistêmica, resultante de um desbalanço entre processos pró- e anti-inflamatórios, que constitui o supracitado fenótipo *inflamm-aging* (FRANCESCHI et al., 2000). Esse, por sua vez, está associado com um risco aumentado para o surgimento de doenças crônicas não transmissíveis como doença pulmonar obstrutiva crônica, doença de Alzheimer, hipertensão, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) entre outros (DIVO; MARTINEZ; MANNINO, 2014).

Curiosamente, esse desbalanço pró-inflamatório e pró-oxidante é também observado em indivíduos portadores de obesidade (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011; MARSEGLIA et al., 2014), assim como o risco aumentado também para DM2 (LUFT et al., 2013; PEREIRA; ALVAREZ-LEITE, 2014), doenças cardiovasculares (CVD) (POIRIER et al., 2006) e cânceres (DENG et al., 2016), sugerindo uma forte relação entre a obesidade e o envelhecimento.

Além disso, evidências crescentes sugerem que o ambiente modificado e estressor que caracteriza o tecido adiposo na obesidade pode ser responsável pela disseminação do fenótipo senescente. A exemplo disso, a literatura relata um aumento de até 30 vezes no número de pré-adipócitos senescentes em relação a indivíduos não obesos (TCHKONIA et al., 2010) além de um aumento no número de linfócitos T senescentes infiltrantes no tecido adiposo em murinos (SHIRAKAWA et al., 2016). Porém, existem poucas evidências sobre a presença do fenótipo senescente e seu real impacto em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes portadores de obesidade.

Nesse sentido, resultados prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram a indução de senescência celular também em PBMC de indivíduos portadores de obesidade, evidenciado pela erosão e perda da homeostase telomérica e pelo aumento de dano em diferentes tipos de macromoléculas como DNA, proteínas e lipídios (GRUN et al., 2018).

Observamos ainda a capacidade do plasma de indivíduos portadores de obesidade de induzir o fenótipo senescente em PBMC de indivíduo saudável e sem sobrepeso, demonstrando a importância de biomoléculas presentes no plasma na indução da imunossenescência. Esse perfil foi observado através da imunomodulação de células saudáveis a um perfil hiporreativo associado com a expressão reduzida da molécula co-estimulatória CD28, aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8) (PARISI et al., 2017) e comprometimento da sinalização e resposta celular (PARISI et al., Manuscrito em preparação).

Porém, embora nossos trabalhos demonstrem uma relação causal entre elementos presentes no plasma de indivíduos portadores de obesidade e o fenótipo imunossenescente, ainda faltam dados acerca dos mecanismos e vias moleculares e celulares envolvidos no estabelecimento desse fenótipo diante do contexto da obesidade.

#### **1.4. MicroRNAs no contexto regulatório**

Considerando a falta de dados acerca dos mecanismos e vias moleculares e celulares envolvidos no estabelecimento do fenótipo imunossenescente diante do contexto da obesidade e pensando na complexidade fisiológica dos organismos, percebemos que a alteração de expressão de uma única proteína dificilmente explica inteiramente um fenótipo, sendo muito mais provável que essas alterações ocorram através de uma rede interligando diferentes proteínas e moléculas. De fato, esse paradigma tem ganhado espaço crescente na academia, uma vez que, a partir dos dados gerados após a conclusão do sequenciamento do genoma humano nos anos 2000, descobriu-se que dificilmente existe uma relação causal direta entre um gene ou proteína e um fenótipo (NOBLE, 2008).

Assim, mais importante do que a definição de genes específicos como determinantes do fenótipo é a busca de um conjunto de moléculas envolvidas no estabelecimento desse fenótipo em resposta a estresses celulares associados utilizando-se abordagens sistêmicas.

Para tal, os microRNAs tem se mostrado objetos de estudo bastante promissores devido a sua relativa promiscuidade regulatória, o que os torna importantes pontos de integração de diferentes vias de resposta celular. Essa promiscuidade regulatória ocorre como consequência da capacidade dos microRNAs de se ligar e regular simultaneamente diversos genes. Porém, para melhor compreender seu papel biológico, é importante conhecer sua estrutura e mecanismos de atuação a nível molecular.

Os microRNAs são sequências de RNA de fita simples não codificante com aproximadamente 22 nucleotídeos (nt) de comprimento muito estudadas devido à sua capacidade de regular pós-transcricionalmente a expressão de uma grande variedade de genes envolvidos em diferentes funções celulares. Essa regulação se dá devido à presença de um domínio na região 5' dos microRNAs crucial para o reconhecimento dos genes-alvo chamada *microRNA seed*, a qual se liga por complementariedade ao RNA mensageiro (RNAm) do gene recém transcrito em uma amplitude que varia de 6 a 8 nt, sendo capaz, então, de impedir que o mesmo seja traduzido a proteína. Assim, mesmo que um gene seja transcrito, caso um microRNA contendo uma sequência complementar a do RNAm-alvo também seja expresso, a proteína, que é tradicionalmente a unidade funcional do gene, não será sintetizada (RUPAIMOOLE; SLACK, 2017).

Porém, o grande impacto dos microRNAs em sistemas biológicos complexos parece estar contido em seu potencial integrador, justificado pela sua capacidade de se ligar de forma específica a várias RNAm diferentes, os quais, por sua vez, podem estar envolvidos em vias de sinalização celular diversas. Essa complexidade é possível porque um único miRNA pode conter uma *microRNA seed* complementar a milhares de RNAm, podendo regular a expressão de um amplo espectro de genes. O inverso também é verdadeiro e cada gene pode apresentar sítios para ligação para 50 miRNAs diferentes. Essa peculiaridade permite a formação de uma complexa rede de interação e regulação (GUNARATNE et al., 2010), onde mais de 60% dos

genes codificantes de proteínas contém ao menos um sítio conservado - sítios de origem filogenética comum sem grandes alterações entre espécies – disponível para ligar-se aos miRNAs (ZHANG; WANG, 2017)

### **1.5. Papel dos microRNAs da indução do fenótipo imunossenesciente**

Existe um número crescente de trabalhos na literatura demonstrando o papel da alteração do perfil de expressão de diferentes miRNAs no desfecho de imunossenescência durante o envelhecimento. Um dos exemplos mais interessantes é o declínio idade-dependente observado na expressão do miR-181a em linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) (NAYLOR et al., 2005).

Atualmente tem-se questionado se a inversão da relação entre linfócitos auxiliares e citotóxicos (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, respectivamente) sugerida como um marcador clássico do fenótipo imunossenesciente, de fato diminui o repertório de células T CD4<sup>+</sup> ao ponto de comprometer sua diversidade e, conseqüentemente, a resposta imune.

Dados da literatura apontam que, ao menos até os 60-65 anos de idade, a redução do repertório de células T CD4<sup>+</sup> não parece suficiente para comprometer a resposta imune, o que ocorre apenas mais tardiamente (NAYLOR et al., 2005). Assim, a perda de responsividade, atribuída ao fenótipo imunossenesciente, se daria muito mais provavelmente por defeitos funcionais da célula.

Reforçando essa hipótese, Li e colaboradores demonstraram que quando a expressão de miR-181a de linfócitos T CD4<sup>+</sup> virgens de doadores com idades entre 75-85 anos foi induzida, houve uma reativação funcional da célula via restauração da capacidade proliferativa e melhora da responsividade a estímulos externos (LI et al., 2012).

De fato, a relevância da expressão do miR-181a na modulação da sensibilidade do receptor de células T (TCR) e na intensidade da sinalização celular já havia sido previamente

descrita, assim, seu declínio parece ter grande relevância no comprometimento da resposta celular em linfócitos T (LI et al., 2007).

Mais recentemente, foi demonstrado o aumento da expressão de miR-21 em células T CD4<sup>+</sup> de indivíduos em idade avançada, bem como seu papel na modulação das subpopulações celulares de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Foi observado que o aumento da expressão de miR-21 favorece a diferenciação de linfócitos T a células efetoras terminais em detrimento de células precursoras de memória, perfil consistente àquele observado em indivíduos de idade avançada e com o perfil imunossenesciente (KIM et al., 2018).

Um trabalho publicado em 2013 por Olivieri e colaboradores propõe três microRNAs alterados no envelhecimento como centrais na regulação simultânea da inflamação, senescência e diferentes tipos de cânceres: miR-126, miR-21 e miR-146 (OLIVIERI et al., 2013).

Mir-21 é um conhecido onco-miR (microRNA associado com câncer) cuja expressão elevada regula positivamente a expressão de proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e a progressão tumoral. Porém, miR-21 é capaz de aumentar a expressão do fator de transcrição nuclear kappa b (NF-kB) via inibição da proteína de morte celular programada 4 (PDCD4) após ativação de macrófagos com lipopolissacarídeo (LPS) e também de reduzir a expressão de moléculas anti-inflamatórias como IL-10 e fator de transformação do crescimento beta (TGF-β), posicionando-a como uma molécula central na regulação de processos pró-inflamatórios. Além disso, a superexpressão de miR-21 é capaz de reduzir a vida replicativa da célula, sugerindo seu papel na indução da parada da replicação celular (OLIVIERI et al., 2013).

Por seu papel em processos pró-inflamatórios e inibição da capacidade replicativa da célula, além do aumento na sua expressão observado em indivíduos octagenários e centenários, miR-21 foi proposto por Olivieri e colaboradores como um biomarcados do inflamm-aging (OLIVIERI et al., 2012) .

Já miR-126 tem papel regulatório em processos inflamatórios via proteínas de adesão como a molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1). Além disso, participa da ativação de NF- $\kappa$ B através da inibição de *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha* (I $\kappa$ B $\alpha$ ) (OLIVIERI et al., 2013) e está elevado em indivíduos em idade avançada (OLIVIERI et al., 2014).

MiR-146a também atua sobre a regulação de NF $\kappa$ B é apontada como um regulador chave da resposta imune inata, sendo capaz de inibir a proteína quinase associada ao receptor de interleucina-1 (IRAK1) e o receptor associado ao fator de necrose tumoral-6 (TRAF6) inibindo por consequência NF $\kappa$ B (OLIVIERI et al., 2013).

Um outro marcador que tem se mostrado como um promissor regulador do sistema imune e do processo de imunossenescência é o miR-92a. Esse microRNA também sofre um declínio na sua expressão em células T CD8<sup>+</sup> associado ao envelhecimento, que acompanha a redução da porcentagem da subpopulação de linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) virgens. Assim, é possível observar uma correlação entre a quantidade de células T citotóxicas virgens e a expressão de miR-92a, sugerindo que a maior parte do miR-92a detectado é proveniente de células T CD8 virgens (OHYASHIKI et al., 2011). Porém, se o declínio de miR-92a é causa ou consequência da redução da subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> virgens é uma pergunta que ainda permanece em aberto.

Mas não apenas em linfócitos T são observadas alterações no perfil de microRNAs em associação com o envelhecimento. A exemplo, um estudo demonstrou o aumento na expressão de miR-146a associado ao comprometimento da sinalização de macrófagos após estimulação com LPS em ratos em idade avançada (JIANG et al., 2012).

Interessantemente, apesar da expressão basal elevada do miR-146a em macrófagos de ratos mais velhos em relação a ratos jovens, ao serem desafiadas com estímulo pró-inflamatório

induzido por LPS, essas células não tiveram a expressão de miR-146a alterada, enquanto no grupo jovem esse tratamento acarretou em um aumento de aproximadamente 6 vezes na expressão desse microRNA após estímulo. Esses resultados parecem indicar que o aumento basal (provavelmente crônico) de miR-146a resulta no comprometimento funcional de macrófagos mediante estímulo (JIANG et al., 2012).

Um efeito muito semelhante foi observado ainda diante de estímulos com IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6, os quais mimetizam o ambiente pró-inflamatório observado no envelhecimento (JIANG et al., 2012).

Esses resultados somados apontam a importância dos microRNAs como reguladores e mantenedores de processos associados a homeostase de células do sistema imune e como possíveis indutores no fenótipo imunossenesciente mediante um ambiente pró-inflamatório estressor.

Esse efeito é particularmente interessante considerando que os microRNAs são constantemente transportados na circulação empacotados em estruturas denominadas microvesículas, tornando-se potenciais reguladores parácrinos e endócrinos capazes de induzir alterações pós-transcricionais a nível sistêmico, colocando-os em evidência como unidades propagadoras do fenótipo senescente e indutoras do envelhecimento precoce. De fato, um número crescente de alterações na expressão de microRNAs circulantes tem sido descrito para doenças associadas ao envelhecimento, destacando-os como promissores biomarcadores e potenciais alvos-terapêuticos (WEILNER et al., 2013).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Um número crescente de evidências aponta para os paralelos existentes entre o envelhecimento cronológico e a obesidade, como por exemplo um estado de inflamação crônica sistêmica de baixo grau, o encurtamento telomérico e aumento no número de células

senescentes - características intimamente relacionadas a perda de função e envelhecimento celular. Desse modo, faz sentido que ambas sejam estudadas como condições semelhantes, compartilhando alterações a nível celular e molecular.

Porém, o impacto da imunossenescência, bastante debatido em associação ao envelhecimento, ainda é muito pouco compreendido na obesidade. Resultados prévios do nosso grupo apontaram para uma relação causal entre biomoléculas circulantes no plasma de indivíduos portadores de obesidade e a indução de imunossenescência em PBMC. Porém, existem poucas informações acerca dos mecanismos e vias moleculares pelos quais o fenótipo imunossenesciente é induzido a nível periférico no contexto pró-inflamatório crônico e sistêmico observado em pacientes portadores de obesidade.

Assim, com o objetivo de compreender como de fato se estabelece o fenótipo imunossenesciente, se faz necessária uma abordagem sistêmica e integradora, tornando os microRNAs objetos de estudo extremamente interessantes em decorrência da sua capacidade de regular simultaneamente diferentes processos e vias celulares, fazendo jus a complexidade fenotípica que compõe uma doença multifatorial como a obesidade.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Compreender a relevância da imunossenescência na obesidade e quais os conjuntos de proteínas e microRNAs capazes de regular o fenótipo imunossenesciente diante do ambiente estressor pró-inflamatório observado em PBMC indivíduos portadores de obesidade.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- 3.2.1. Buscar, utilizando técnicas de bioinformática, uma lista de proteínas envolvidas no estabelecimento da imunossenescência e do *inflamm-aging*.
- 3.2.2. Averiguar, através de técnicas de bioinformática, quais os microRNAs que regulam as proteínas previamente propostas como reguladoras dos fenótipos imunossenescência e *inflamm-aging*.
- 3.2.3. Validar em PBMC de indivíduos portadores de obesidade e controle os dados mais relevantes fornecidos pelas análises *in silico*.

## **PARTE II**

## **4. CAPÍTULO I: MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. População do estudo:**

#### **4.1.1. Aspectos éticos**

Os participantes portadores de obesidade foram recrutados no Centro de Obesidade e Síndrome Metabólica (COM) do Hospital São Lucas (HSL) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) no período transoperatório de cirurgia bariátrica. As coletas foram realizadas por uma equipe treinada no ambulatório de cirurgia Bariátrica e Metabólica do HSL da PUCRS. O grupo controle é constituído por indivíduos eutróficos, sem comorbidades associadas à obesidade e que realizaram exames de rotina. A identificação, seleção e recrutamento dos indivíduos controle participantes foi realizada pelo grupo da professora Dra. Florencia Barbé-Tuana (Prof<sup>a</sup> adjunta de Imunologia do PPGBCM – PUCRS). Todos os indivíduos participantes deste estudo eram maiores de 18 anos e leram, concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), em duas vias de igual teor (Anexo 1). Foi resguardado o sigilo em torno da identidade de cada indivíduo participante.

Esse estudo utilizou amostras previamente coletadas em projeto previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CAAE: 26793114.0.0000.5347), sob o protocolo nº 640.817 (Anexo 2) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CAAE: 2956014.4.1001.5336), sob o protocolo N° 760.537 (Anexo 3) e foi conduzido de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e as diretrizes éticas internacionais para pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos (CIOMS 2002; [HTTP://www.cioms.ch/](http://www.cioms.ch/)), respeitando a utilização da menor quantidade de material biológico possível.

#### **4.1.2. Critérios de inclusão e exclusão**

Os participantes voluntários, que previamente assinaram o TCLE, foram divididos em dois grupos: indivíduos diagnosticados como portadores de obesidade ou obesidade mórbida, com índice de massa corporal (IMC)  $\geq 35,0$  kg/m<sup>2</sup>, foram alocados no grupo “casos” (n = 19); enquanto aqueles classificados como controles eutróficos, com IMC entre 18,5 kg/m<sup>2</sup> e 24,9 kg/m<sup>2</sup>, foram alocados no grupo “controles” (n = 22). Fizeram parte deste estudo indivíduos entre 18 e 65 anos de ambos os sexos e foram excluídos, em ambos os grupos, os indivíduos consumidores crônicos de medicação controlada (antidepressivos ou ansiolíticos), álcool, tabaco, e aqueles que tenham sofrido ou sofram de câncer.

#### **4.1.3. Coleta do material biológico**

As coletas foram realizadas por uma equipe treinada durante o período transoperatório, no ambulatório de Cirurgia Bariátrica e Metabólica do Hospital São Lucas da PUCRS. Os controles eutróficos foram recrutados por conveniência da comunidade e a coleta foi realizada também por equipe treinada. Foram coletados 10 mL de sangue periférico dos indivíduos participantes por punção venosa em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 5%. Em seguida, o sangue foi cuidadosamente transferido para tubos de 15 mL contendo Histopaque<sup>®</sup>-1077 (densidade: 1,077 g/mL, Sigma Aldrich) na razão de 1:1 e então, centrifugado a 400 RCF por 30 min, sem freio. Após separação por gradiente de densidade, as PBMC foram aspiradas, lavadas e ressuspensas em tampão fosfato-salino (PBS). O rendimento e a viabilidade celular foram determinados pela contagem em hemocítmetro, com o corante Azul de Tripán (Sigma Aldrich), em microscópio de contraste de fase. As células foram então armazenadas em TRIzol (Invitrogen, EUA) ou congeladas em soro fetal bovino (SFB) com 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich).

## 4.2. Microarranjos e Análise de Expressão Diferencial

Para a obtenção de uma lista de microRNAs diferencialmente expressos em PBMC de pacientes portadores de obesidade e respectivos controles, foi inicialmente realizada uma busca por microarranjos cadastrados no repositório público curado *Gene Expression Omnibus* (GEO) por meio de sua interface de buscas *web* disponibilizada em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> (Edgar, 2002). Para tanto utilizou-se como termos de busca (*MESH terms*): "*obesity (obese) AND miRNA AND PBMC*" ou "*obesity (obese) AND miRNA AND monocyte*" ou ainda "*obesity (obese) AND miRNA AND lymphocyte*". Foram ainda adicionados filtros para adequação a critérios pré-estabelecidos de estudo: *Homo sapiens* como filtro de espécie e *Expression Profile by array* como filtro de estudo.

Cada resultado foi então individualmente analisado e foram excluídos do estudo microarranjos que não tivessem sido previamente normalizados e cujas amostras não se adequavam aos critérios pré-estabelecidos: células mononucleares de sangue periférico de organismos da espécie humana com diagnóstico de obesidade ou obesidade mórbida humana.

## 4.3. Análise Ontológica

Com o objetivo de descobrir quais genes participam simultaneamente do fenótipo inflamatório e do fenótipo de envelhecimento, foi realizada uma busca por todos os genes anotados para ambas as condições, independentemente, na base de dados *Gene Ontology Consortium* (ASHBURNER et al., 2000; THE GENE ONTOLOGY RESOURCE: 20 YEARS AND STILL GOING STRONG, 2019) disponível em <http://www.geneontology.org/>. A partir das duas listas encontradas, foram isolados aqueles genes que participavam simultaneamente de ambos os fenótipos (Figura 2).

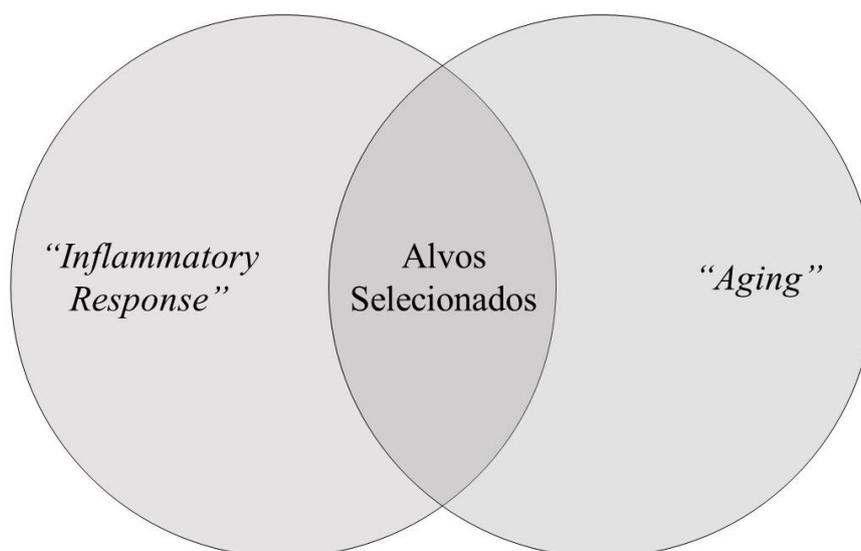


Figura 2. Diagrama de Venn incluindo os termos utilizados na análise ontológica.

#### 4.4. Busca por microRNAs reguladores

A fim de descobrir quais os microRNAs são responsáveis pela regulação dos genes encontrados na intersecção dos fenótipos previamente pesquisados, criou-se um algoritmo escrito em linguagem R, através da interface de programação RStudio. A construção do algoritmo se deu em quatro partes: Importação dos genes e normalização da nomenclatura utilizada, descoberta dos microRNAs reguladores, cálculo do número de interações que cada microRNA faz com os genes da lista e, por fim, filtragem e exportação dos dados encontrados (Figura 3). Durante a primeira etapa, após a importação da lista de 39 genes encontrados na análise anterior, normalizou-se as suas nomenclaturas para o formato *Symbol* apropriado. A descoberta dos microRNAs reguladores foi realizada com auxílio da biblioteca multiMiR (MULTIMIR: INTEGRATION OF MULTIPLE MICRORNA-TARGET DATABASES WITH THEIR DISEASE AND DRUG ASSOCIATIONS VERSION 1.4.0 FROM BIOCONDUCTOR, [s.d.]; RU et al., 2014), buscando-se todos os microRNAs preditos e validados em 8 bases de dados independentemente: Diana\_microt, Elmmo, Microcosm, Miranda, Mirdb, Pictar, Pita e Targetscan. Após, durante a terceira etapa, calculou-se o grau –

número de conexões que cada microRNA descoberto faz com os genes da lista de entrada. Por fim, selecionou-se os microRNAs com grau 18 ou maior que aparecessem em, ao menos, duas bases de dados e os genes por eles regulados.



Figura 3. Fluxograma do algoritmo desenvolvido para análise de busca por microRNAs complementares.

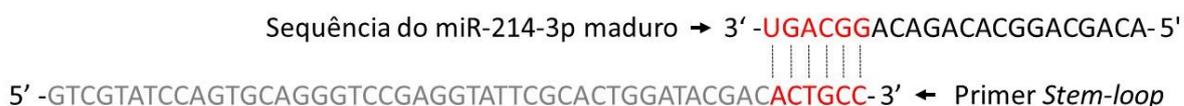
#### 4.5. Análise de Enriquecimento de Via

Com o objetivo de melhor compreender as implicações celulares descritas pelos microRNAs encontrados nas análises anteriores, realizou-se a análise de enriquecimento de via. Para tanto, os 39 genes previamente listados foram submetidos a análise por meio do software ConsensusPathDB (KAMBUROV et al., 2009, 2011), disponível em <http://cpdb.molgen.mpg.de/>, o qual inclui na análise 11 bases de dados, sendo elas Wikipathways, Inoh, Smpdb, Pharmgkb, Biocarta, Kegg, Reactome, Humancyc, Signalink, Ehm e Pid. Foram consideradas significativamente enriquecidas, em qualquer uma das bases

individualmente, as vias com valor de  $P \leq 0,01$  e que apresentassem um mínimo de dois genes da lista de entrada. A representação gráfica dos resultados encontrados foi gerada a partir de algoritmo escrito em R, onde elencou-se as 15 vias mais enriquecidas na análise.

#### 4.6. Desenho de oligonucleotídeos iniciadores específicos

Os oligonucleotídeos iniciadores específicos (ou *primers*) denominados *Stem-loop* e utilizados na reação de síntese de cDNA para a ampliação das sequências dos microRNA foram desenhados individualmente de acordo com Kramer, 2011 (KRAMER, 2011). Estes iniciadores são desenhados a partir de uma sequência padrão de 44 nucleotídeos descrita por Chen et al., 2005 (CHEN et al., 2005) e referida como a ideal por Kramer, à qual é adicionada uma sequência de 6 nucleotídeos complementares à região final 3' do microRNA-alvo maduro, conforme ilustrado acima.



**Figura 4. Modelo exemplificando o desenho de iniciadores específicos de síntese para o microRNA-214-3p.** Em cinza: sequência padrão de 44 nucleotídeos descrita por Chen et al (CHEN et al., 2005); em preto: sequência complementar ao microRNA maduro; vermelho acima: os nucleotídeos manualmente adicionados (também complementares ao microRNA maduro) até atingir a temperatura de 60°C; vermelho abaixo: nucleotídeos do iniciador stem-loop complementares ao microRNA maduro.

As sequências específicas dos microRNAs-maduros selecionados foram obtidas a partir da base de dados miRBase (<http://www.mirbase.org/>).

Os iniciadores direto (5' → 3') e reverso (5' → 3') para análise de expressão gênica foram desenhados também de acordo com Kramer e colaboradores (KRAMER, 2011). A sequência do iniciador reverso é complementar à sequência padrão do *stem-loop*, sendo universal e, portanto, válida para todos os microRNAs sintetizados. A sequência direta contém

no mínimo 12 nt e no máximo 17 nt complementares à sequência 5' → 3' do microRNA-maduro.

A temperatura de dissociação e conteúdo GC são então calculados com auxílio do software disponível em <https://www.idtdna.com/calc/analyzer> e as condições são consideradas ótimas quando a temperatura de dissociação próxima à do iniciadores reverso universal (aproximadamente 60°C) e o conteúdo GC menor do que 60%. Caso a temperatura de dissociação dos iniciadores desenhados fique muito abaixo da temperatura necessária, são adicionados de 3 a 7 nt não complementares à extremidade 5' do iniciador direto, selecionados aleatoriamente e testados até que seja possível a obtenção de uma temperatura de dissociação próxima a 60°C. Os iniciadores *stem-loop*, reverso e direto desenhados e utilizados nesse estudo para detecção de microRNAs estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para síntese e expressão de microRNAs.**

<b>Oligonucleotídeos Iniciadores para expressão de microRNAs</b>		
<b>ID</b>	<b>Sentido</b>	<b>Sequência</b>
hsa-miR-214-3p	D	AGA GCA ACA GCA GGC ACA GAC
hsa-miR-3163	D	CGC CGC TAT AAA ATG AGG GCA GT
hsa-miR-369-3p	D	CCG CCG CAA TAA TAC ATG GTT GAT
hsa-miR-374b-5p	D	CGC CGC CAT ATA ATA CAA CCT GCT
hsa-miR-495-3p	D	GCT CGC AAA CAA ACA TGG TGC AC
hsa-miR-520f	D	CGC GCG AAG TGC TTC CTT TTA GA
hsa-miR-548c-3p	D	CGC CGC GCA AAA ATC TCA ATT ACT
hsa-miR-548d-3p	D	CGC CGC CAA AAA CCA CAG TTT C
miR-16-5p	D	CGG CGG TAG CAG CAC GTA AAT
Reverso Universal	R	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA
<b>Oligonucleotídeos Iniciadores para síntese de microRNAs</b>		
<b>ID</b>	<b>Sequência</b>	
hsa-miR-214-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACTGCC	
hsa-miR-3163	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGTCTTA	
hsa-miR-369-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAAAGAT	
hsa-miR-374b-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCACTTA	
hsa-miR-495-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAAGAAG	

hsa-miR-520f	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAACCCCT
hsa-miR-548c-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCAAAA
hsa-miR-548d-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCAAAA
miR-16-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCGCCAA

Os iniciadores para expressão gênica foram desenhados através da utilização de *softwares* variados. A sequência dos genes foi primeiramente obtida no banco de dados ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/index.html>), onde foram inseridos os genes alvo e a espécie amostral (“*human*”) para verificação dos diferentes transcritos. Uma vez selecionado o transcrito desejado, priorizando aqueles descritos em mais de uma base de dados, sua sequência foi inserida em software disponibilizado pela IDT®, específico para obtenção de iniciadores direto e reverso (<https://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>). Uma vez obtidas as sequências, sua especificidade foi testada através do algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*, disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, o qual permite ver todos os alvos gênicos contemplados pelos iniciadores inseridos. De acordo a sugestão do programa, foram considerados ótimos os iniciadores com auto-complementariedade < 2, conteúdo GC de no máximo 55%, com temperatura de anelamento próxima entre os iniciadores direto e reverso e cujos alvos inespecíficos, quando presentes, apresentassem um número superior a 1.000 pares de bases. Os oligonucleotídeos iniciadores reverso e direto desenhados e utilizados nesse estudo para detecção de genes específicos estão listados na Tabela 2.

**Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para síntese e expressão gênica.**

<b>Oligonucleotídeos iniciadores para expressão gênica</b>			
<b>ID</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Tamanho amplicon</b>	<b>Sequência</b>
<i>PRKCD</i>	NM_001354676.1	187 pb	Direto: ACCATGAGTTTATCGCCACC Reverso: AATATAGTGTCCCGGCTGTTG
<i>MAPK14</i>	NM_001315.2	102 pb	Direto: CTCCAGACCATTTTCAGTCCATC Reverso: ACGTCCAACAGACCAATCAC
<i>AKT1</i>	NM_005163.2	192 pb	Direto: CTACAACCAGGACCATGAGAAG Reverso: CACACGATACCGGCAAAGA
<i>STAT3</i>	NM_139276.2	279 pb	Direto: TTCTGGGCACAAACACAAAAG Reverso: GATACACCTCGGTCTCAAAGG

<i>SERPINE1</i>	NM_000602.4	122 pb	Direto: TGCAGAAAGTGAAGATCGAGG Reverso: CACAAAGAGGAAGGGTCTGTC
<i>ICAM1</i>	NM_000201.3	179 pb	Direto: CGGAAGGTGTATGAACTGAGC Reverso: CAGCGTAGGGTAAGGTTCTTG
<i>RAGE</i>	NM_001206929.1	114 pb	Direto: GTGAAGGAACAGACCAG Reverso: GAAGCTACAGGAGAAGGTGG

#### 4.7. Extração de RNA e síntese de cDNA

Previamente à extração de RNA, as células ( $0,5 \times 10^6$ ) foram armazenadas em 750  $\mu$ L de TRIzol (Invitrogen) a  $-80^\circ\text{C}$ . Após descongelamento, foi realizada a adição de 200  $\mu$ L de clorofórmio a cada amostra seguida por agitação manual vigorosa por 15 segundos e incubação por 15 minutos a temperatura ambiente. Após nova centrifugação (12.000 RCF, 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ ) a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga e o material genético foi precipitado com 500  $\mu$ L de álcool isopropílico e suavemente misturado por inversão. As amostras foram novamente incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugadas a 1.200 RCF por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Após descarte do sobrenadante, foi adicionado 1 mL de etanol 70% (em água livre de RNases previamente tratada com 0,1% dietilpirocarbonato (DEPC, Ambion®) e realizada nova centrifugação a 7500 RCF por 5 minutos ainda a  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e as amostras foram então mantidas em capela de fluxo laminar por 20 minutos para evaporação do etanol remanescente para garantia da pureza das amostras. O RNA obtido foi ressuspendido em 12  $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1% DEPC) e então quantificado no espectrofotômetro (Biophotometer®Plus, Eppendorf, Alemanha) a 260 nm e 280nm.

Foram utilizadas 1.500  $\mu$ g de RNA como molde para a síntese de cDNA com a enzima Transcriptase Reversa do Vírus da Leucemia Murina de Moloney (M-MuLV) (Sigma-Aldrich), oligonucleotídeos randômicos (Sigma-Aldrich) para detecção dos genes-alvo e iniciadores *Stem-loop* específicos para cada microRNA previamente selecionado.

#### 4.8. Análise de expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)

Para avaliação da expressão gênica e de microRNAs foi realizada a amplificação dos alvos listados na Tabela 1 a partir de 5µL de cDNA (diluição 1:20 e concentração de 25ng em 20 µL finais de reação). A mistura utilizada para amplificação e detecção de cada amostra é constituída por 0,1X SYBR®Green (Molecular Probes®, EUA), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen™), 0,4 U de *Platinum® Taq DNA polymerase* (Invitrogen™) e oligonucleotídeos específicos nas concentrações listadas na Tabela 2, com volume final igual a 20 µL. Os resultados relativos de cada amostra foram calculados pelo método comparativo relativo  $\Delta\Delta CT$ , normalizados pelo gene constitutivo GNB2L1 (*Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1*) ou U6 para microRNAs e calibrados pela média do  $\Delta CT$  do grupo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001)

**Tabela 3. Relação de temperatura de anelamento e concentração final de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos experimentos de qRT-PCR.**

ID	Temperatura de anelamento	Concentração final
miR-374b-5p	60°C	100nM
miR-214-3p	60°C	100nM
U6	60°C	100nM
MAPK14	60°C	100nM
AKT1	60°C	200nM
STAT3	58°C	200nM
GNB2L1	60°C	100nM

Para a amplificação das sequências dos genes-alvo, as amostras foram submetidas a variações de temperatura específicas para uma reação de desnaturação (95 °C por 10 minutos) seguida por 40 ciclos contemplado uma reação de desnaturação (95 °C por 20 segundos) e outra de anelamento com temperatura específica (Tabela 2) para cada iniciador específico durante 20 segundos, seguido da curva de dissociação.

#### 4.9. Citometria de fluxo

Para detecção da expressão proteica do receptor de produtos finais da glicação avançada (RAGE) em PBMC, monócitos e linfócitos T citotóxicos por citometria de fluxo, as PBMC ( $0,4 \times 10^6$  células/mL) foram lavadas e incubadas por 30 minutos com os anticorpos de superfície contra CD4-APC (clone: RPA-T4, BD #555349), CD14-PE (clone: M $\phi$ P9, BD #562691) e RAGE (clone: A-9, SC-365154) seguido pelo anticorpo secundário IgG-FITC (SC-2010, Santa Cruz). Para os ensaios de marcação intracelular de proteínas fosforiladas, as PBMC ( $0,5 \times 10^6$ ) foram previamente incubadas com Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA) por 15 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e então marcadas NF- $\kappa$ B- Alexa Fluor® 488 (pS529) (clone: K10-895.12.50, BD #558421) e P38 proteína quinase ativadas por mitógeno (MAPK)-PE (pT180/pY182) (clone: 36/p38, BD #612565). Para marcações de superfície foi utilizado tampão de citometria (2% SFB em PBS) e para marcações intracelulares os reagents *BD Cytotfix™ Fixation Buffer* (BD #554655), *BD Perm/Wash™* (BD #554723) e *BD Phosflow™* (BD #558050). As amostras foram adquiridas e analisadas no citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, EUA). Os dados foram expressos como porcentagem de células positivas para os antígenos detectados e/ ou através da mediana de intensidade de fluorescência (MFI).

#### 4.10. Tratamento de resíduos químicos e biológicos

Todos os materiais contendo resíduos biológicos inertes e/ou tóxicos tiveram formas de descarte distinto e transitório no laboratório, sendo estes depois transferidos para seus respectivos destinos definitivos. Resíduos biológicos foram inativados com hipoclorito e acondicionados em sacos brancos. Os materiais plásticos descartáveis, como tubos de poliestireno e ponteiros que entraram em contato com material biológico, foram tratados com hipoclorito e acondicionados em sacos transparentes para encaminhamento para reciclagem por intermédio da Central de Gerenciamento e Tratamento de Rejeitos Químicos (CGTRQ). O

recolhimento dos resíduos biológicos e plásticos não-recicláveis foi realizado pelo serviço específico da empresa contratada pela UFRGS.

Os resíduos químicos foram separados adequadamente, identificados, armazenados transitoriamente em sala destinada para este fim e recolhidos pela Central de Gerenciamento e Tratamento de Rejeitos Químicos (CGTRQ) da UFRGS.

#### **4.11. Análises estatísticas**

O teste estatístico de D'agostino/ Pearson foi utilizado a fim de verificar a normalidade na distribuição das amostras para cada variável. Os testes para presença e remoção de *outliers* foram realizados por Iterative Grubbs' e a comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste Mann-Whitney para amostras não paramétricas e não pareadas e teste t de *Student* para amostras paramétricas não pareadas. Os resultados estão representados como mediana e intervalo interquartil (IQR<sub>25-75</sub>). Já nas análises para comparação das proporções de sexo entre grupos foi utilizado o teste exato de Fisher. Para as análises de correlação os dados foram também testados para normalidade da distribuição através do teste estatístico de D'agostino/ Pearson e os coeficientes de correlação foram analisados pelo coeficiente de correlação de Pearson para dados paramétricos ou coeficiente de correlação de postos de Spearman para dados não-paramétricos. Para todas as análises utilizou-se o programa GraphPad Prism versão 6.0. Todos os testes foram bidirecionais e as diferenças foram consideradas significativas quando  $P \leq 0,05$ .

## 5. CAPÍTULO II: RESULTADOS

### 5.1. Dados demográficos das populações em estudo

Foram utilizadas amostras de coletas realizadas em dois tempos diferentes. Os dados relativos aos pacientes e controles eutróficos analisados em experimentos utilizando qRT-PCR (n = 14 e n = 10 para controles e casos, respectivamente) e citometria de fluxo (n = 8 e n = 10 para controles e casos, respectivamente) constam na Tabela 3. Conforme esperado, não foram observadas diferenças entre sexo (P = 0,1747) ou idade (P = 0,5806) entre os grupos casos e controles, enquanto observa-se um maior índice de massa corporal (IMC) no grupo casos (P ≤ 0,0001), representado por pacientes portadores de obesidade.

**Tabela 4. Dados demográficos.**

	<b>Indivíduos Eutróficos</b>	<b>Indivíduos com Obesidade</b>
Tamanho amostral	n = 22	n = 19
Sexo Feminino (%)	81,81%	63,16%
Idade <sup>a</sup> (anos)	37,14 ± 2,452	39,11 ± 2,530
IMC <sup>b</sup> (Kg/m <sup>2</sup> )	22,13 ± 0,4122	53,15 ± 2,105 **
<b>Comorbidades</b>		
HAS	-	7 (70,00%)
DM2	-	3 (30,00%)
SM	-	5 (50,00%)
DIS	-	5 (50,00%)
AS	-	4 (40,00%)

Nota: Os dados demográficos representam indivíduos avaliados neste estudo através de técnicas de qRT-PCR (n = 14 e n = 10 para controles e casos, respectivamente) e citometria de fluxo (n = 8 e n = 10 para controles e casos, respectivamente). As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do teste *t* de *Student* para IMC e idade e consideradas significativas quando P < 0,05. Para análise comparativa entre proporções de sexo foi utilizado o teste exato de Fisher. As comorbidades dos pacientes que aceitaram participar da segunda coleta (para experimentos em citômetro de fluxo) não foram informadas. IMC: Índice de Massa Corporal; DP: Desvio Padrão; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; DM2: Diabetes Mellitus Tipo 2, SM: Síndrome Metabólica; DIS: dislipidemia; AS: apneia do sono; <sup>a,b</sup>Dados representados por Média ± Desvio Padrão. \*\* P ≤ 0,0001

## 5.2. Busca por microRNAs em microarranjos para PBMC de indivíduos portadores de obesidade

Ao buscarmos por microarranjos avaliando a expressão de microRNAs em PBMC de indivíduos portadores de obesidade, nos deparamos com uma baixa disponibilidade dos mesmos. Na busca pelos termos médicos: “*obesity (obese) AND miRNA AND PBMC*” ou “*obesity (obese) AND miRNA AND monocyte*” ou ainda “*obesity (obese) AND miRNA AND lymphocyte*”, com adição de filtro para espécie humana, encontramos apenas dois microarranjos: GSE89360 (HUAN et al., 2018) e GSE34223 (HULSMANS et al., 2012); descritos em detalhe na Tabela 4.

Após aferição individual, o microarranjo GSE89360 (HUAN et al., 2018) foi eliminado por utilizar amostras de pacientes idosos e não de pacientes com obesidade, conforme o objetivo do presente estudo. Assim, restou apenas um microarranjo para microRNAs em PBMC de indivíduos com obesidade para análise (GSE34223 (HULSMANS et al., 2012)). Não havendo disponíveis múltiplos ensaios para comparação e garantia de robustez entre os dados, não pudemos conferir a reprodutibilidade, ou seja, a capacidade de diferentes experimentos de produzir os mesmos resultados, e, portanto, a existência de um resultado biológico confiável do microarranjo encontrado (GSE34223 (HULSMANS et al., 2012)). O problema da não garantia de um resultado biológico real se torna mais grave quando o nosso objeto de estudo são PBMC, modelo em que se sabe que a grande oscilação das proporções celulares pode resultar em falsos-positivos para genes diferencialmente expressos (MIN et al., 2010; Pierdoná, V., manuscrito em produção).

Tendo isso em mente, passamos a buscar alternativas para a confecção de uma lista de genes relevantes na regulação das alterações observadas em PBMC de indivíduos portadores de obesidade.

**Tabela 5. Relação e descrição dos microarranjos encontrados na busca por microRNAs identificados em pacientes portadores de obesidade.**

<b>GEO Data Set</b>	<b>Descrição</b>	<b>Referência</b>
<b>GSE89360</b>	PBMC de 48 indivíduos não obesos (IMC<30 kg/m <sup>2</sup> ) poloneses e caucasianos pertencentes a: jovem (n=24, média de idade ± desvio padrão 28.0±4.0 anos) e idosos (n=24, 94.8±3.9 anos)	<b>Huan et al., 2018</b>
<b>GSE34223</b>	Monócitos CD14 <sup>+</sup> de doadoras do sexo feminino, com 6 controles não obesos pareados por idade (IMC: 20±0.8 kg/m <sup>2</sup> , média ± desvio padrão) e 9 indivíduos com obesidade sem sintomas críticos de doença cardiovascular.	<b>Hulsmans et al., 2012</b>

### **5.3. Genes associados a “*inflammatory response*” e “*aging*”**

Afim de contornar o problema resultante da baixa representatividade observada em microarranjos de PMBC, passamos a buscar genes por sua descrição funcional. Conforme citado anteriormente, existem muitos paralelos entre o envelhecimento cronológico e a obesidade, entre eles o envelhecimento celular, que se reflete na perda da capacidade celular de responder estímulos e um perfil pró-inflamatório crônico e de baixo grau. Essas características combinadas, associadas a outros fenótipos, compõem o *Inflamm-aging* e/ ou a imunossenescência.

Afim de encontrar genes associados ao fenótipo *Inflamm-aging*, o qual parece ter papel fundamental no comprometimento funcional observado na obesidade, realizamos uma busca ontológica na base de dados *Gene Ontology*. A partir dessa busca obtivemos uma lista de 996 proteínas relacionadas a resposta inflamatória (“*Inflammatory response*”) e outra com 334 proteínas relacionadas a envelhecimento (“*Aging*”). Considerando que estas são as duas características principais do que denominamos *Inflamm-aging* e que estas são compartilhadas com o fenótipo imunossenescente, a partir da intersecção destas duas primeiras, obtivemos uma lista contendo 39 genes candidatos relacionados ao *Inflamm-aging* ou imunossenescência (Tabela 5).

#### 5.4. MicroRNAs reguladores dos fenótipos imunossenescência ou *Inflamm-aging*

Uma vez que o objetivo do presente trabalho é buscar moléculas reguladoras do *Inflamm-aging* e, por associação, da imunossenescência, e considerando a capacidade dos microRNAs de formar complexas redes regulatórias, foi realizada uma busca pelos microRNAs reguladores dos genes envolvidos com o fenótipo *Inflamm-aging* através da utilização de um algoritmo escrito em linguagem R com interface de execução RStudio.

Afim de identificar os microRNAs mais relevantes para a regulação do fenótipo *Inflamm-aging*, adaptamos a ideia de “*hubs*” e selecionamos apenas os microRNAs capazes de realizar um grande número de interações, atuando, assim, como nodos centrais da sinalização celular. Obtivemos então uma lista com 8 microRNAs capazes de realizar no mínimo 18 interações com os genes associados *Inflamm-aging* e, portanto, propostos como centrais para o estabelecimento deste fenótipo.

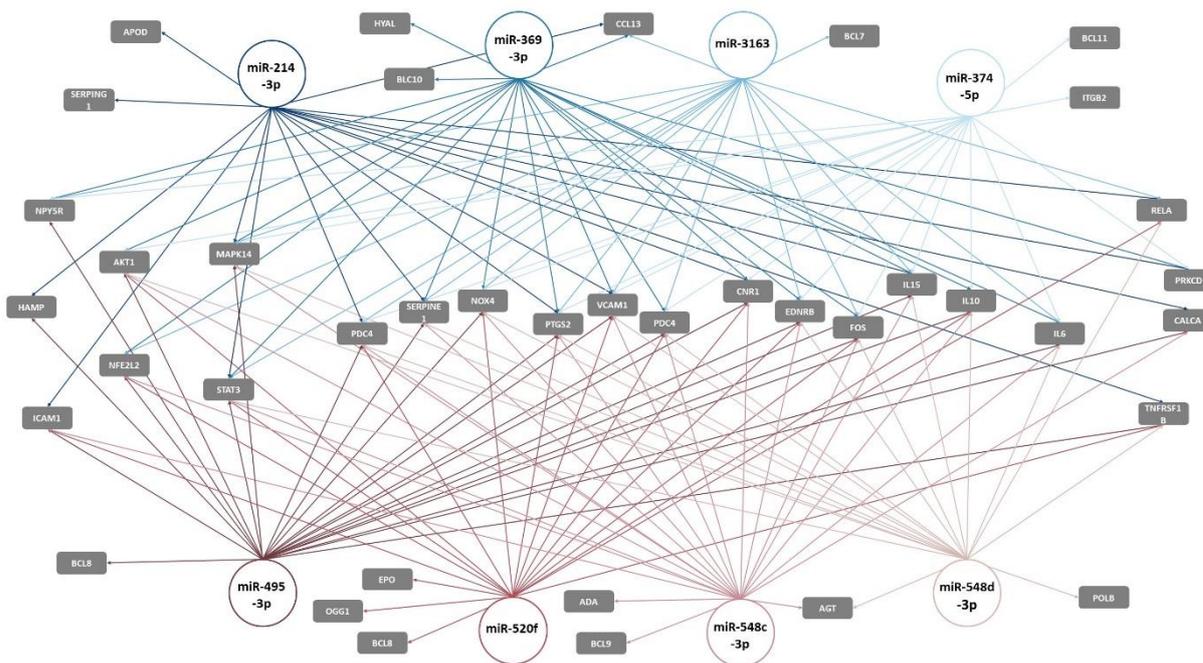
A Tabela 6 apresenta os microRNAs com maior potencial regulatório para o fenótipo *Inflamm-aging*, bem como seus respectivos alvos gênicos. Da mesma forma, a Figura 5 exemplifica a complexa rede de interação celular formada por 39 proteínas e respectivos microRNAs reguladores envolvida na regulação do *Inflamm-aging*.

**Tabela 6. Oito microRNAs centrais capazes de realizar 18 ou mais interações entre os 39 genes envolvidos no fenótipo *Inflamm-aging*.**

Gene	hsa-miR-214-3p	hsa-miR-3163	hsa-miR-369-3p	hsa-miR-374b-5p	hsa-miR-495-3p	hsa-miR-520f	hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-548d-3p
<i>VCAM</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>PDC4</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>PTGS2</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>CNR1</i>	X	X	X	X	X	X	X	
<i>EDNRB</i>		X	X	X	X	X	X	X
<i>FOS</i>		X	X	X	X	X	X	X
<i>IL15</i>	X	X	X	X	X		X	X
<i>MAPK14</i>	X	X	X	X	X		X	X
<i>NOX4</i>		X	X	X	X	X	X	X

<i>PDC4</i>	X	X		X	X	X	X	X
<i>SERPINE1</i>	X	X	X		X		X	X
<i>STAT3</i>	X	X	X		X	X	X	X
<i>AKT1</i>			X	X	X	X	X	X
<i>IL10</i>			X	X	X	X	X	X
<i>IL6</i>		X	X	X	X		X	X
<i>NFE2L2</i>		X	X	X	X	X	X	
<i>ICAM1</i>	X				X	X	X	
<i>NPY5R</i>		X	X	X	X			
<i>RELA</i>	X	X				X		X
<i>TNFRSF1B</i>	X				X	X		X
<i>CALCA</i>	X				X		X	
<i>CCL13</i>	X	X	X					
<i>PRKCD</i>	X		X	X				
<i>AGT</i>							X	X
<i>HAMP</i>	X				X			
<i>HYAL</i>			X					
<i>BCL10</i>			X					
<i>BCL7</i>		X						
<i>ITGB2</i>				X				
<i>ADA</i>							X	
<i>APOD</i>	X							
<i>BCL11</i>				X				
<i>BCL6</i>						X		
<i>BCL8</i>					X			
<i>BCL9</i>							X	
<i>EPO</i>						X		
<i>HYLA</i>								
<i>OGG1</i>						X		
<i>POLB</i>								X
	<b>hsa-miR-214-3p</b>	<b>hsa-miR-3163</b>	<b>hsa-miR-369-3p</b>	<b>hsa-miR-374b-5p</b>	<b>hsa-miR-495-3p</b>	<b>hsa-miR-520f</b>	<b>hsa-miR-548c-3p</b>	<b>hsa-miR-548d-3p</b>

Nota: Marcados com a letra “X” estão os genes com sítio de ligação e regulação para os microRNAs listados.



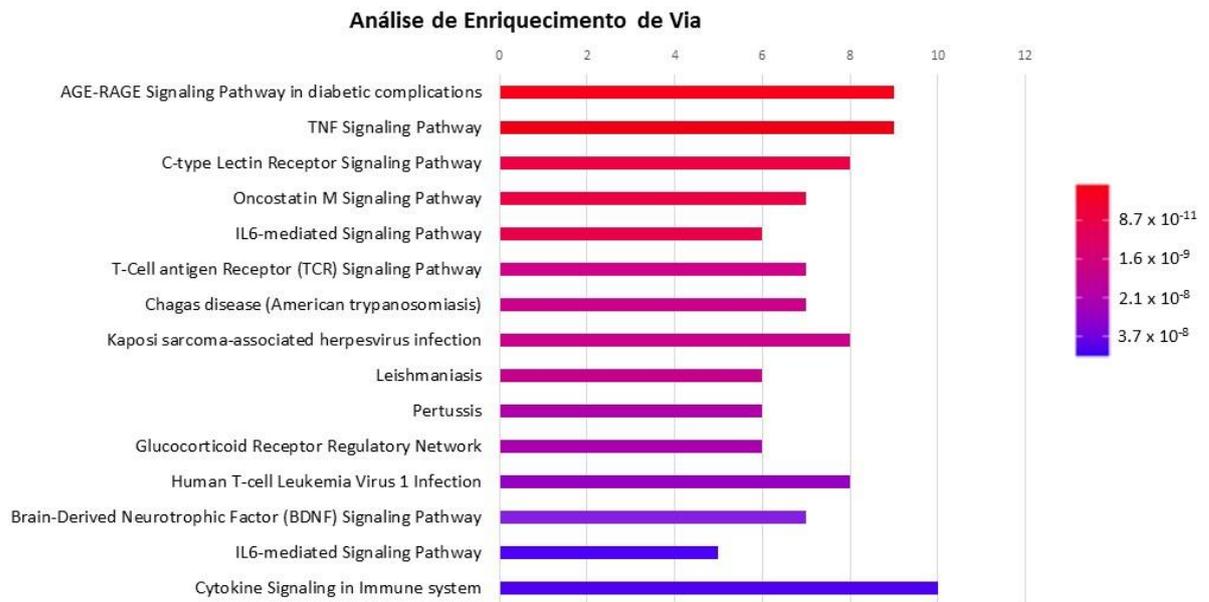
**Figura 5.** Rede de interações ilustrando os 8 microRNAs capazes de realizar 18 ou mais interações e os 39 genes envolvidos no fenótipo *Inflamm-aging* por eles regulados. As interações realizadas por cada microRNA aparecem indicados em cores distintas. A rede também está disponível online com possibilidade de ampliação através do *QR Code* ou link de acesso pelo navegador, disponíveis ao final do trabalho (Anexo 4).

### 5.5. Papel central da via AGE-RAGE no fenótipo *Inflamm-aging*

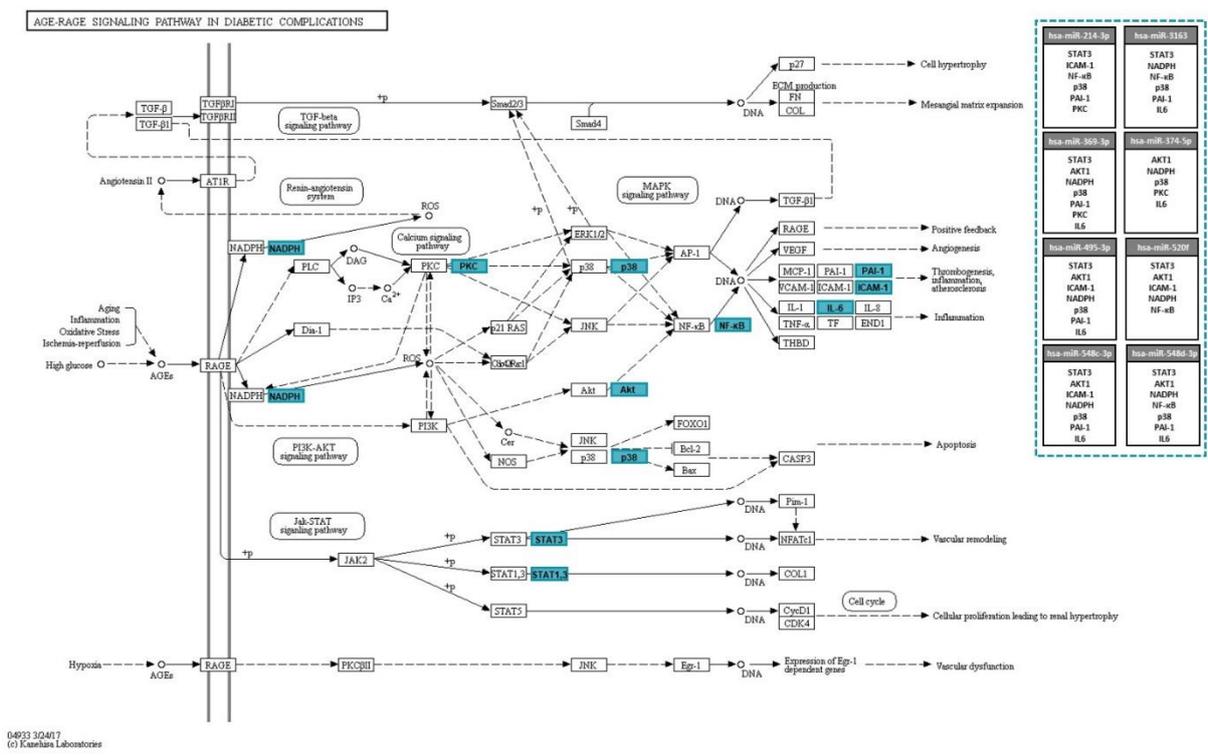
Afim de compreender o papel biológico das proteínas apontadas como centrais para o fenótipo *Inflamm-aging* nas análises de bioinformática, realizamos uma análise de enriquecimento de via para encontrar a via regulatória com maior relevância para 39 genes previamente listados.

Estão representadas abaixo as 15 vias de sinalização celular mais enriquecidas entre os genes previamente descritos como reguladores do *Inflamm-aging* (intersecção entre os termos ontológicos “*Ageing*” e “*Inflammatory response*”), sendo a via AGE-RAGE (*advanced glycation end-products/receptor advanced glycation end-products*) apontada como a mais enriquecida entre elas (Figura 6).

Dentro da via AGE-RAGE podemos observar, destacados em azul, os genes previamente descritos para o fenótipo *Inflamm-aging*, listados também à direita, abaixo de seus respectivos microRNAs reguladores (Figura 7).



**Figura 6. Representação das 15 vias mais enriquecidas, obtidas a partir da análise de enriquecimento de via pelo software ConsensusPathDB, entre os genes descritos para o fenótipo *inflamm-aging*. No eixo horizontal acima está representado o número de genes presentes na lista descrita neste trabalho para o fenótipo *inflamm-aging* e simultaneamente anotados para as vias representadas nas bases de dados *online*. O valor de significância P está indicado na barra à direita.**

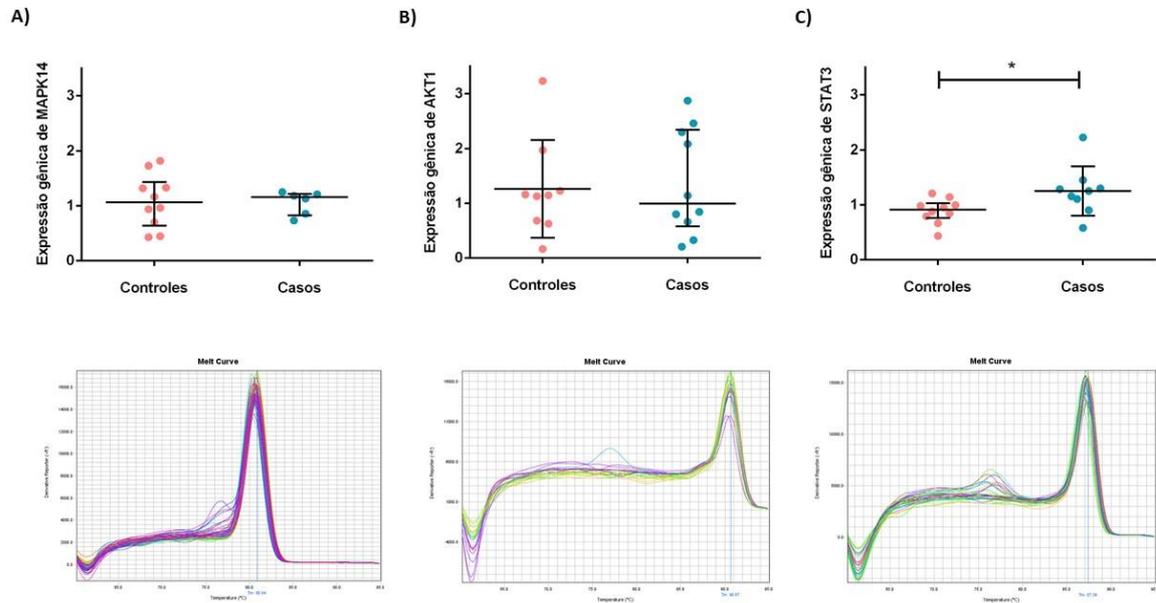


**Figura 7. Via de sinalização “AGE-RAGE in diabetic complications”, apontada como a via de sinalização mais enriquecida entre os genes do *Inflamm-aging* (P = 1,14e-12) pelo software *ConsensusPathDB*. Imagem adaptada a partir da base de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEEG). À direita estão listados os 8 microRNAs-chave, juntamente com seus respectivos alvos proteicos (destacados também em azul na via). PKC refere-se à PRKCD e NADPH à NOX4. Esta figura também está disponível online com possibilidade de ampliação através do *QR code* ou link de acesso pelo navegador, disponíveis ao final do trabalho (Anexo 5).**

### 5.6. Regulação transcricional da via de sinalização AGE-RAGE

Afim de averiguar o status transcricional das proteínas envolvidas na via de sinalização AGE-RAGE, apontada como a via mais enriquecida dentre os genes do fenótipo *Inflamm-aging*, e investigar a relação entre esses alvos e seus respectivos microRNAs reguladores, realizamos análises de expressão gênica por qRT-PCR de alguns dos alvos da via regulados por microRNAs. Foram obtidas as expressões gênicas de MAPK14, AKT1 e STAT3.

Dos 3 alvos analisados, somente STAT3 de mostrou significativamente aumentada em PBMC de indivíduos portadores de obesidade ( $P = 0,0369$ ) (Figura 8), enquanto a expressão MAPK14 e AKT1 se mostrou similar entre os grupos.

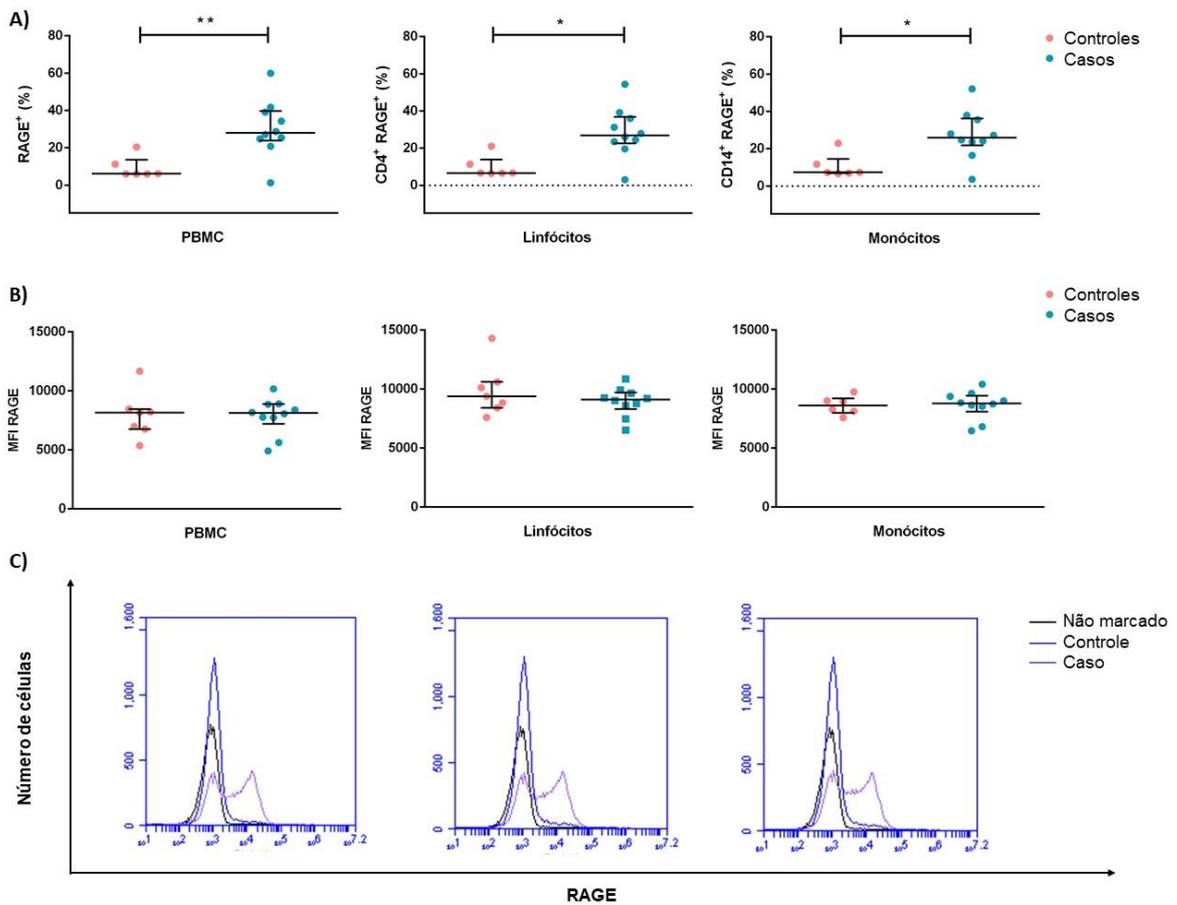


**Figura 8. Aumento da expressão gênica de STAT3 em PBMC de pacientes portadores de obesidade (casos) ( $P = 0,0369$ ) e níveis similares de MAPK14 e AKT1 entre os grupos.** Os gráficos representam a expressão gênica relativa realizada a través da técnica de RT-qPCR para A) MAPK14, B) AKT1 e C) STAT3. Gráficos inferiores representam as curvas de dissociação para MAPK14, AKT1 e STAT3. Os dados estão representados por Mediana e Intervalo Interquartil (Mediana  $\pm$  IQR 25%-75%). Os testes de normalidade foram realizados utilizando o teste D'Agostino/Pearson e as diferenças estatísticas foram avaliadas por teste *t* de *Student* para dados paramétricos ou Mann-Whitney para dados não-paramétricos. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P \leq 0,05$ . \* $P < 0,05$

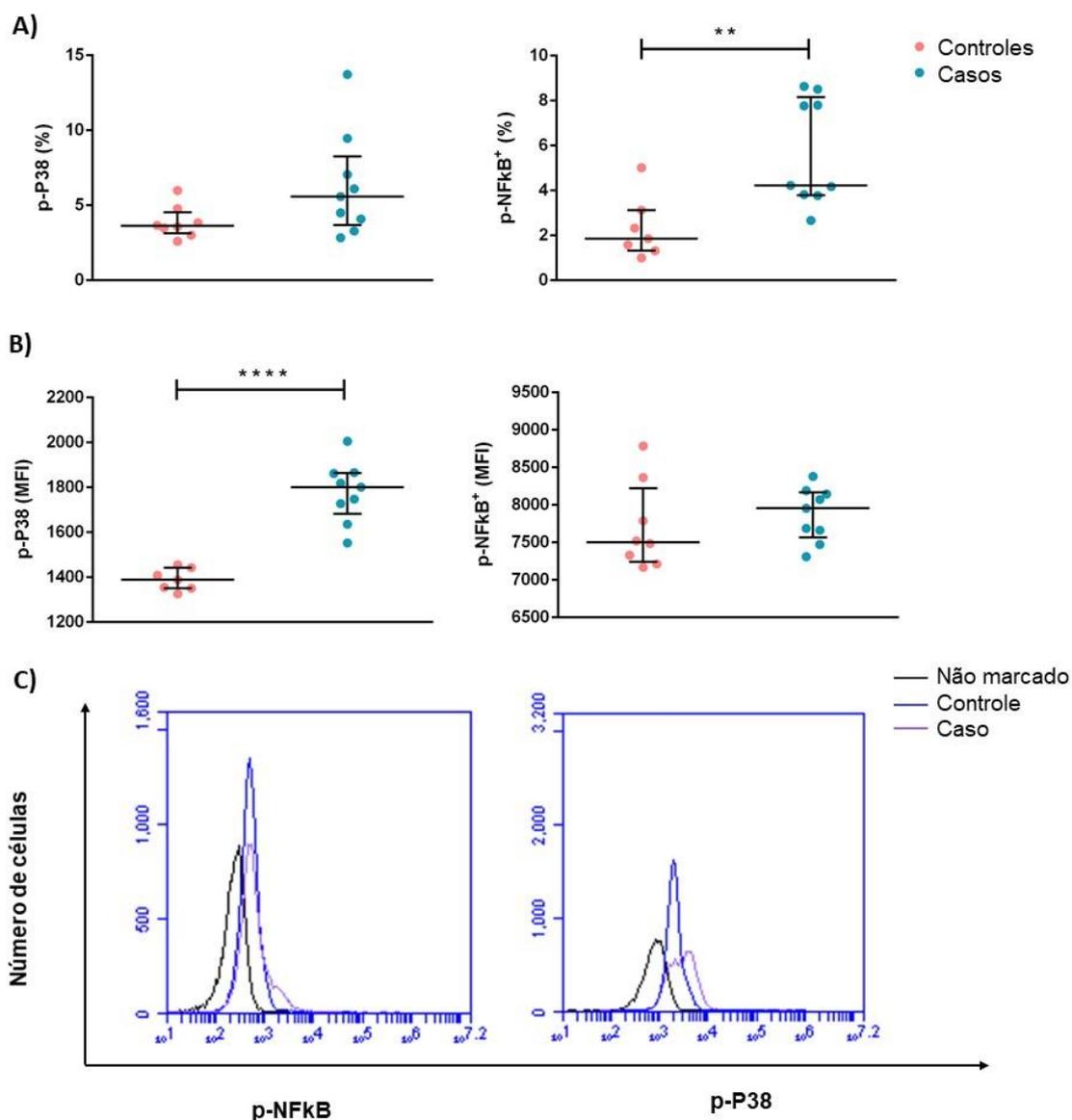
### 5.7. Expressão aumentada de RAGE em pacientes portadores de obesidade

Afim de conferir o status da via de sinalização AGE-RAGE, apontada como a via mais enriquecida dentre os genes do fenótipo *Inflamm-aging*, verificamos a expressão e ativação de algumas proteínas envolvidas na via por citometria de fluxo. Foram analisadas a expressão proteica do receptor RAGE, o qual quando é ativado e tem sua transcrição induzida pela ligação de produtos finais da glicação avançada (AGEs) – entre outras biomoléculas -, e os níveis de fosforilação das proteínas intermediárias NF- $\kappa$ B e P38.

Os resultados demonstram um aumento no número de células expressando RAGE em PBMC de pacientes portadores de obesidade em relação a indivíduos eutróficos ( $P = 0,0075$ ), também observado isoladamente nas populações de linfócitos T auxiliares  $CD4^+$  ( $P = 0,0110$ ) e monócitos  $CD14^+$  ( $P = 0,0110$ ) (Figura 9). Além disso, ao analisarmos a ativação por fosforilação de proteínas presentes na via de sinalização AGE-RAGE, observamos um aumento na quantidade de células expressando a proteína fosforilada RELA/p65, que compõe o NF- $\kappa$ B ( $P = 0,0052$ ) e no nível de expressão da proteína fosforilada P38 ( $P < 0,0001$ ) em indivíduos portadores de obesidade (Figura 10).



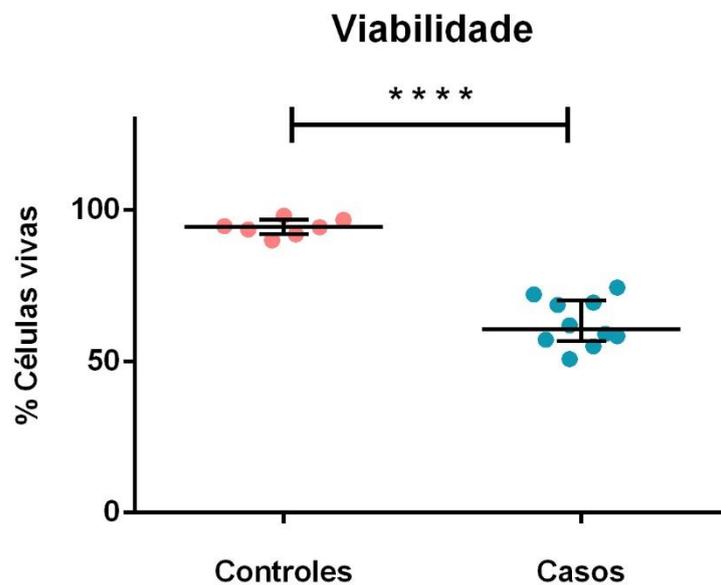
**Figura 9. Aumento da expressão de RAGE em PBMC de indivíduos portadores de obesidade avaliada por citometria de fluxo.** A) Número aumentado de células expressando RAGE em PBMC (P = 0,0075), linfócitos T auxiliares (P = 0,011) e monócitos (P = 0,011) em indivíduos portadores de obesidade. B) Mediana da intensidade de fluorescência (MFI) para RAGE em PBMC, monócitos e linfócitos T auxiliares. C) Histogramas representativos da expressão de RAGE em pacientes portadores de obesidade e controles eutróficos. Os dados apresentados estão expressos como Mediana e Intervalo Interquartil (Mediana ± IQR 25%-75%). Os testes de normalidade foram realizados utilizando o teste D'Agostino/Pearson e as diferenças estatísticas foram avaliadas por teste t de *Student* para dados paramétricos ou Mann-Whitney para dados não-paramétricos. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P \leq 0,05$ . \* $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$ .



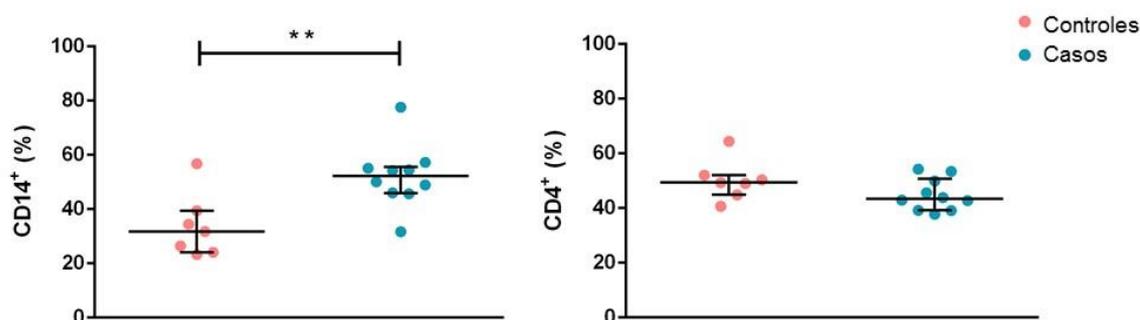
**Figura 10. Sinalização aumentada de NF-kB e P38 em indivíduos portadores de obesidade.** As PBMC ( $0,5 \times 10^6$  células/mL) foram estimuladas em cultura por 15 minutos com PMA 50 nM e analisadas por citometria de fluxo através da técnica *phosflow*. A) Foi observado um aumento no número de células com fosforilação do fator p65 de NF-kB ( $P = 0,0052$ ) e B) na MFI da expressão da proteína fosforilada P38 ( $P < 0,0001$ ) em PBMC de indivíduos portadores de obesidade. C) Histogramas representativos da expressão de p-NF-kB e p-P38 em PBMC de indivíduos controles e portadores de obesidade. Os dados apresentados estão expressos como Mediana e Intervalo Interquartil (Mediana  $\pm$  IQR 25%-75%). Os testes de normalidade foram realizados utilizando o teste D'Agostino/Pearson e as diferenças estatísticas foram avaliadas por teste t de *Student* para dados paramétricos ou Mann-Whitney para dados não-paramétricos. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ ; \* $P < 0,01$  e \*\*\*\* $P < 0,0001$ . MFI: Mediana da intensidade de fluorescência.

## 5.8. Redução da viabilidade celular e aumento no número de monócitos em pacientes com obesidade

Após descongelamento, a viabilidade das células de indivíduos eutróficos e portadores de obesidade foi avaliada com o corante Azul de Tripan (Sigma Aldrich). Foi observada uma diminuição significativa na viabilidade celular em PBMC de indivíduos portadores de obesidade em relação aos controles eutróficos ( $P \leq 0,0001$ ) (Figura 11). Foi observado ainda, por citometria de fluxo, um aumento significativo no número de monócitos (células CD14<sup>+</sup>) em pacientes portadores de obesidade ( $P = 0,0058$ ) (Figura 12).



**Figura 11. Redução da viabilidade celular em PBMC de indivíduos portadores de obesidade.** Os dados estão representados por Mediana e Intervalo Interquartil (Mediana  $\pm$  IQ 25%-75%). Os testes de normalidade foram realizados utilizando o D'Agostino/Pearson e as diferenças estatísticas foram avaliadas por teste *t* de *Student* e consideradas significativas quando  $P \leq 0,05$ . \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ .



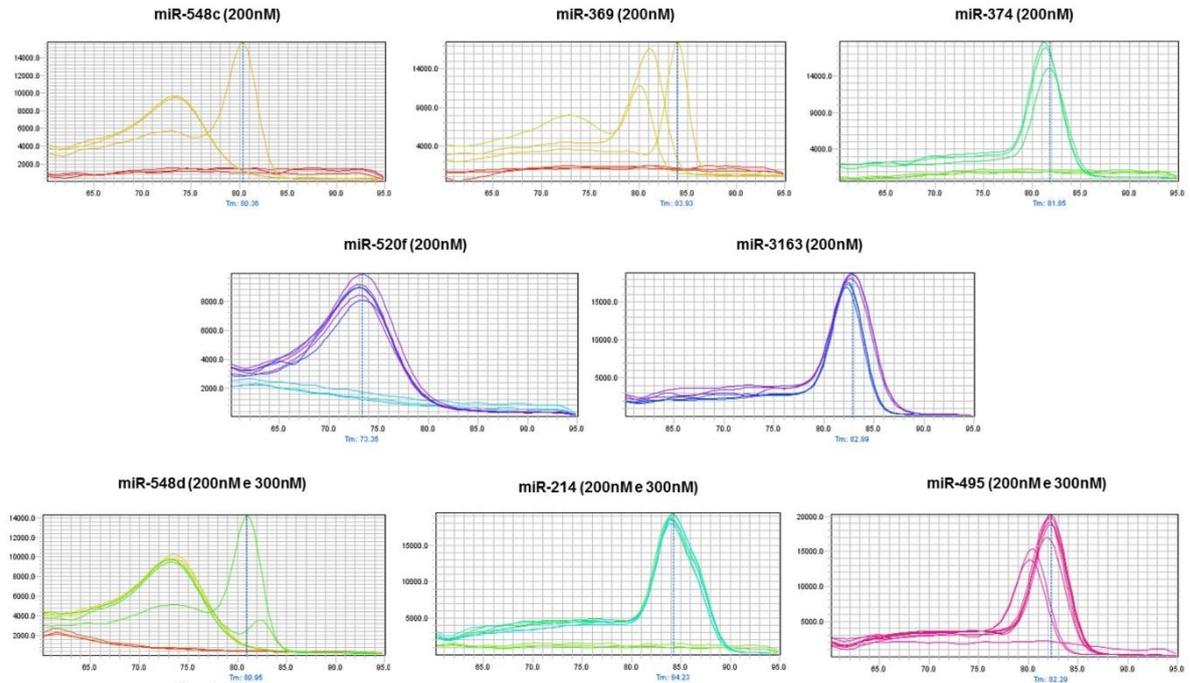
**Figura 12. Aumento na proporção de monócitos (CD14+) em indivíduos portadores de obesidade.** A quantificação de A) monócitos CD14+ e B) linfócitos T auxiliares CD4+ foi realizada em citômetro de fluxo. Os dados estão representados por Mediana e Intervalo Interquartil (Mediana  $\pm$  IQR 25%-75%). Os testes de normalidade foram realizados utilizando o teste D'Agostino/Pearson e as diferenças estatísticas foram avaliadas por teste *t* de Student e consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . \*\*  $P < 0,01$ .

### 5.9. Padronização da detecção de microRNAs por qRT-PCR

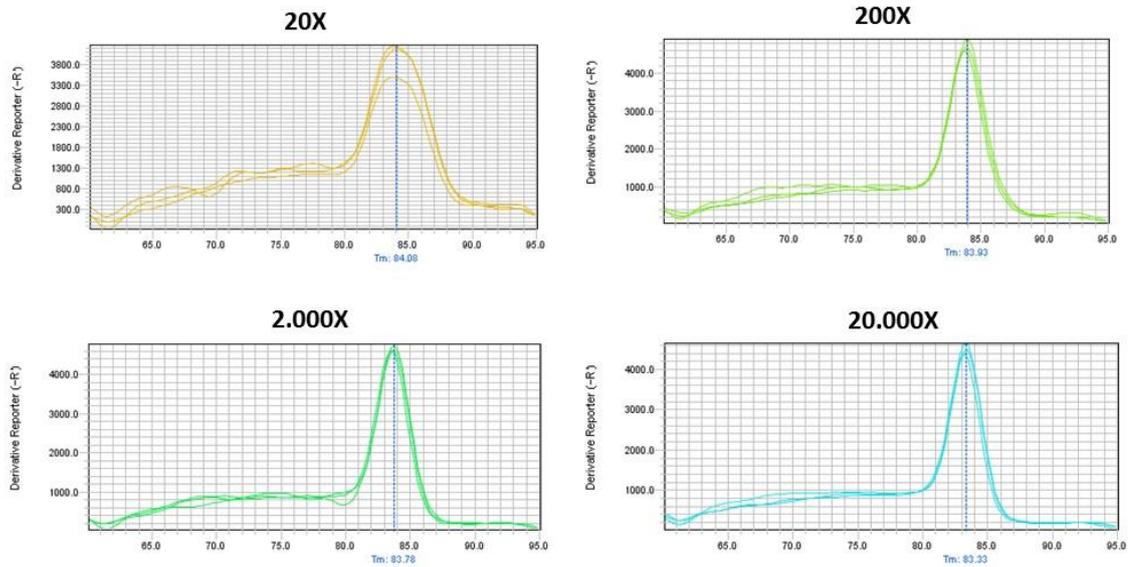
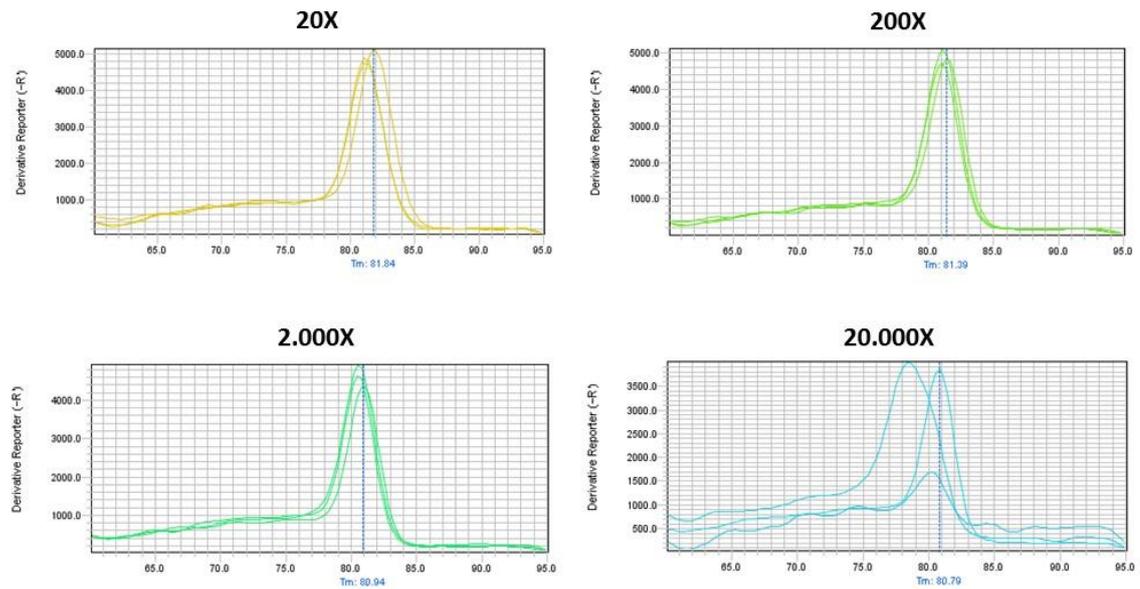
Afim de padronizar a detecção de microRNAs por qRT-PCR foram inicialmente testadas diferentes concentrações de cada um dos iniciadores específicos. Após testes utilizando 100nM, 200nM e 300nM para cada um dos iniciadores a uma temperatura de anelamento de 60°C foram testadas as concentrações com maior eficiência de reação: 200nM para miR-548c, miR-369, miR-374, miR-520f e miR-3163 e 200nM e 300nM para miR-548d, miR-214 e miR-495 (Figura 13). MiR-374 e miR-214 foram os únicos que apresentaram pico único alvo-específico e cuja amostra de controle negativo não amplificou (o que poderia indicar a formação de dímeros de iniciadores).

Foram também testadas diferentes concentrações de diluição da amostra de cDNA, na tentativa de otimizar a reação de qRT-PCR e garantir um resultado mais acurado. A partir de uma amostra estoque de 2  $\mu$ g diluída 20X, foram realizadas diluições seriadas de 1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000. Todos os ensaios foram realizados com temperatura de anelamento de 60°C iniciadores específico a 200nM. A concentração escolhida foi a de 200X (concentração final de

2,5ng) com base na eficiência das reações dos microRNA-214 e microRNA-374 com base na amplitude e similaridade entre as triplicatas observadas na curva de dissociação (Figura 14).



**Figura 13. Curva de dissociação utilizando diferentes iniciadores em concentrações variadas para detecção de microRNAs específicos.** A análise da expressão de microRNAs foi realizada por qRT-PCR para: miR-548c, miR-369, miR-374, miR-520f, miR-3163, miR-548d, miR-214 e miR-495. Após a etapa de amplificação, foi incluída a curva de dissociação com detecção do fluoróforo SYBRGreen.

**A)****miR-214****B)****miR-374**

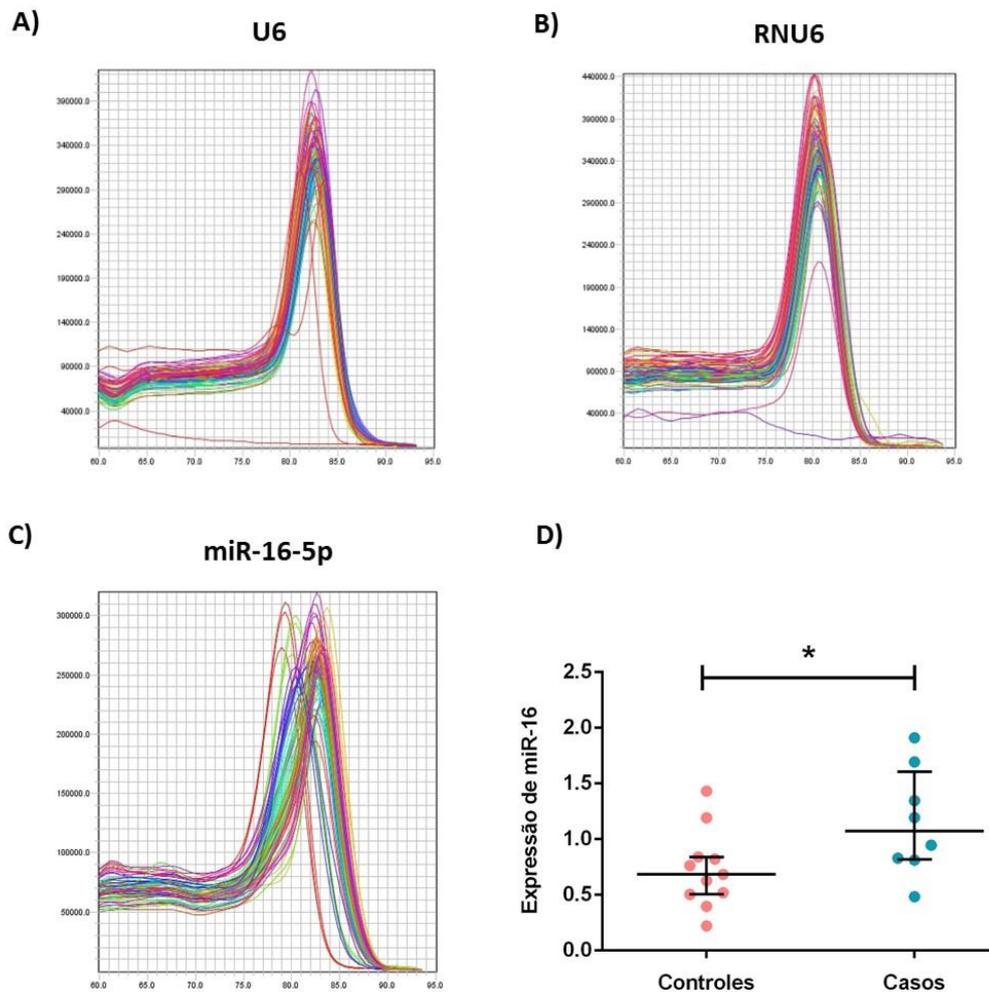
**Figura 14. Curva de dissociação utilizando diferentes iniciadores para o microRNA-214 (A) e microRNA-374 (B) em diferentes concentrações de amostra: 1:1 (2µg diluída 20X), 1:10 (200X), 1:100 (2.000X) e 1:1000 (20.000X). Após a etapa de amplificação, foi incluída a curva de dissociação com detecção do fluoróforo SYBRGreen.**

### 5.10. Seleção de controle endógeno para microRNAs

Afim de selecionar o melhor controle endógeno para cálculo e normalização dos dados de expressão de microRNAs, foram testados diferentes iniciadores recomendando pela literatura: U6, RNU6 e miR-16-5p.

O produto de amplificação gerado por U6 mostrou-se alvo-específico (Figura 15<sup>a</sup>). Além disso, em análises utilizando o software *GeNorm* (<https://genorm.cmgg.be/>), U6 mostrou-se o alvo mais estável entre os grupos analisados (casos e controles), tendo sido selecionado como controle endógeno para este estudo.

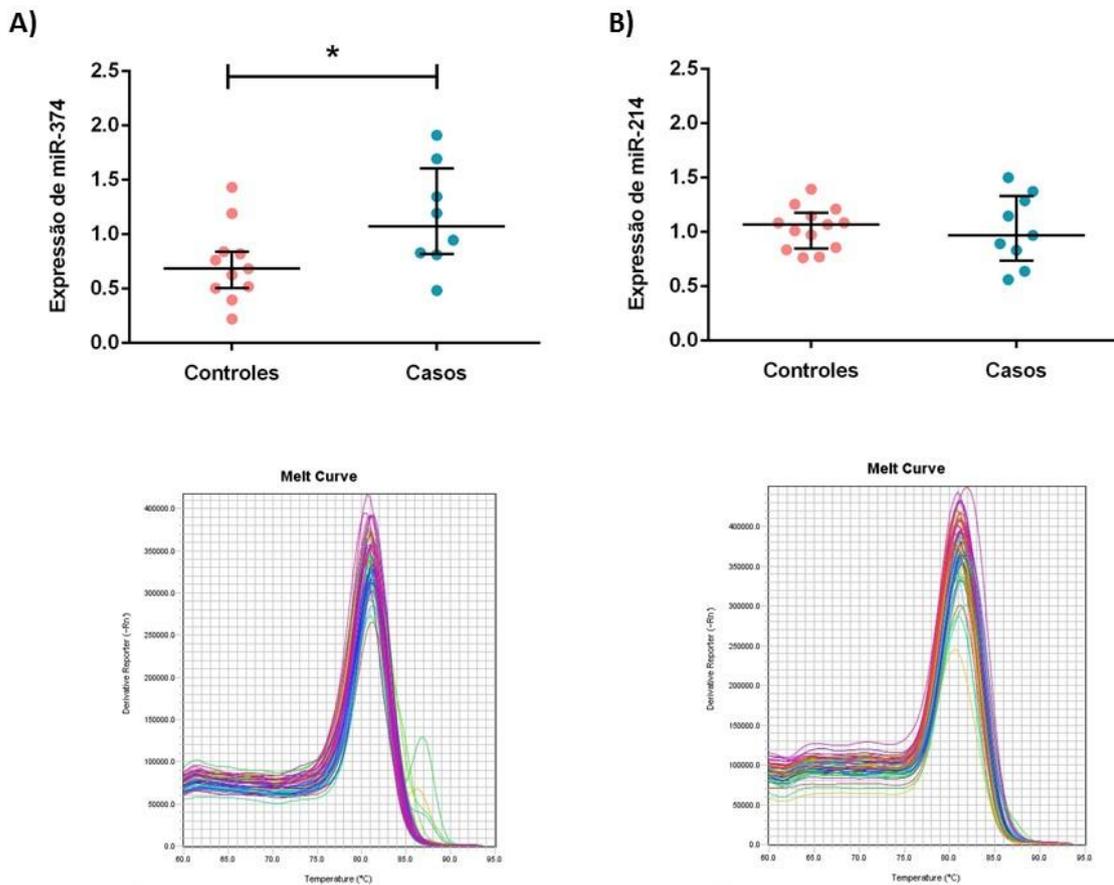
RNU6 foi eliminado por apresentar pico da curva de dissociação idêntico ao controle negativo, demonstrando amplificação inespecífica (Figura 15B). Já o microRNA-16-5p, citado na literatura como um controle endógeno bastante robusto, apesar de ter apresentado amplificação alvo-específica (Figura 15C), se mostrou extremamente variável entre os grupos analisados (casos e controles), inclusive apresentando-se elevado em PBMC de indivíduos portadores de obesidade após normalização por U6 ( $P = 0,0386$ ) (Figura 15D).



**Figura 15. Curva de dissociação dos diferentes oligonucleotídeos iniciadores testados para controle endógeno de microRNAs e expressão aumentada de miR-16 em pacientes com obesidade.** Estão representadas as curvas de dissociação de A) U6, B) RNU6 C) miR-16-5 e D) gráfico demonstrando expressão aumentada de miR-16 após normalização por U6 em PBMC de pacientes portadores de obesidade. A curva de dissociação do controle negativo de U6 (A) aparece em vermelho com pico em regiões diferentes daquele apresentado pelas amostras, demonstrando a especificidade da reação. Já para RNU6 (B), o pico de dissociação do controle negativo aparece sobreposto às amostras, demonstrando amplificação inespecífica. Em miR-16-5p o pico de dissociação do controle negativo aparece em vermelho deslocado à esquerda, demonstrando amplificação específica. Podemos observar ainda o D) aumento da expressão de miR-16-5p em PBMC de pacientes portadores de obesidade ( $P = 0,0386$ ). Os dados estão representados por Mediana e Intervalo Interquartil (Mediana  $\pm$  IQR 25% -75%). Os testes de normalidade foram realizados utilizando o teste D'Agostino/Pearson e as diferenças estatísticas foram avaliadas por teste t de Student e consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . \*  $P < 0,05$

### 5.11. Alterações no perfil de microRNAs em PBMC de indivíduos com obesidade

Afim de verificarmos se os microRNAs apontados como reguladores do fenótipo *Inflamm-aging* estão alterados na obesidade, realizamos a detecção por qRT-PCR de hsa-miR-374b-5p e hsa-miR-214-3p. Observamos um aumento na expressão do hsa-miR-374b-5p em PBMC de pacientes portadores de obesidade ( $P = 0,0386$ ), enquanto não houve diferença na expressão de hsa-miR-214-3p entre os grupos (Figura 16).



**Figura 166. A) Aumento na expressão do hsa-miR-374b-5p em pacientes portadores de obesidade ( $P = 0,0386$ ) e B) nível de expressão similar de hsa-miR-214-3p entre os grupos.** Nos quadrantes inferiores estão representadas as curvas de dissociação para controle de especificidade dos alvos detectados. Os dados estão representados por Mediana e Intervalo Interquartil (Mediana  $\pm$  IQR 25%-75%). Os testes de normalidade foram realizados utilizando o teste D'Agostino/Pearson e as diferenças estatísticas foram avaliadas por teste t de *Student* e consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$ .

## 6. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram a presença de um amplo espectro de proteínas e microRNAs atuantes na regulação dos fenótipos imunossenescência e *Inflamm-aging*, além de evidências biológicas de sua relevância através de alterações observadas na expressão em PBMC de pacientes com obesidade. Foram observados o aumento da expressão proteica de RAGE e da fosforilação das proteínas NF- $\kappa$ B e P38 e o aumento na expressão gênica de STAT3, indicando a ativação da via AGE-RAGE, além de um aumento no microRNA proposto como um dos reguladores centrais dos fenótipos supracitados: hsa-miR-374b-5p.

Visando melhor compreender o impacto da rede composta por proteínas e microRNAs envolvidos no *Inflamm-aging* e afim de encontrar as vias de sinalização mais representativas do fenótipo para posterior validação em amostras biológicas de pacientes portadores de obesidade, realizamos uma análise de enriquecimento de via. Entre as vias de sinalização mais enriquecidas podemos observar, em primeiro lugar, a via “AGE-RAGE in diabetic complications”, seguida por “TNF signaling pathway” e “C-type lectin receptor signaling pathway”, todas (principalmente as duas últimas) já descritas como importantes reguladores da resposta imune (KEGG PATHWAY: AGE-RAGE SIGNALING PATHWAY IN DIABETIC COMPLICATIONS - HOMO SAPIENS (HUMAN), [s.d.]; KEGG PATHWAY: C-TYPE LECTIN RECEPTOR SIGNALING PATHWAY - HOMO SAPIENS (HUMAN), [s.d.]; KEGG PATHWAY: TNF SIGNALING PATHWAY - HOMO SAPIENS (HUMAN), [s.d.]).

É importante ressaltar que nossas análises de bioinformática apontaram para a via de sinalização “AGE-RAGE in diabetic complications” como a mais enriquecida de forma totalmente independente da obesidade, mas relacionada com os fenótipos de envelhecimento e resposta inflamatória. Interessantemente, ao validarmos os alvos preditos pelas análises bioinformática, observamos o aumento de RAGE em PBMC de indivíduos portadores de obesidade em relação a controles eutróficos.

Esse resultado vai ao encontro de estudos realizados em camundongos que apontam o receptor RAGE como um importante regulador da obesidade. Um trabalho realizado por Song e colaboradores demonstrou que a ausência de RAGE em camundongos é capaz de prevenir o ganho de peso e a resistência insulínica promovidos por uma HFD, além de prevenir a infiltração de macrófagos no tecido adiposo perigonadal e a polarização dessas células para um fenótipo mais reativo, ou M1. O mais interessante é que esses dados são observados tanto em camundongos silenciados para RAGE, quanto em animais imunossuprimidos que receberam transfusão de medula óssea de camundongos silenciados para RAGE, demonstrando a relevância de linhagens hematopoiéticas expressando RAGE nas consequências metabólicas e inflamatórias observadas na obesidade (GRANT; DIXIT, 2015).

Além disso, embora não se saiba qual seu real impacto, RAGE tem um papel ativo na propagação de processos inflamatórios, o qual parece consequência principal da ativação de NF- $\kappa$ B, levando ao aumento na expressão de uma série de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. De fato, a importância de RAGE já foi demonstrada em um amplo espectro de doenças pró-inflamatórias como arteriosclerose, doença de Alzheimer, artrite, falha respiratória aguda e, como observado nesse trabalho, na obesidade (CHUAH et al., 2013).

Curiosamente, não foi observada uma diferença na expressão genica da proteína MAPK14 entre grupos, o que poderia apontar para o papel dos microRNAs na manutenção da homeostase celular, impedindo que haja uma ativação excessiva dessa proteína na obesidade e atuando como mecanismo de controle da inflamação. Ao mesmo tempo, esse resultado pode ser uma consequência da heterogeneidade celular observada em PBMC ou das alterações observadas nas proporções das subpopulações estudadas.

Porém, ao analisarmos o perfil de fosforilação de P38 (proteína expressa pelo gene MAPK14), observamos um aumento na ativação dessa proteína em PBMC de obesos. Esses resultados podem sugerir que o principal aumento na ativação de vias pró-inflamatórias não é

via mecanismos de regulação transcricional, mas pelo controle do estado de fosforilação. Contudo, podemos especular que, caso não houvesse um controle pós-transcricional e a expressão gênica de MAPK14 estivesse elevada em PBMC de indivíduos com obesidade, esse aumento poderia ser muito mais dramático.

Entre as demais proteínas presentes na via AGE-RAGE analisadas por qRT-PCR estão AKT1, cuja expressão foi semelhante entre o grupo de pacientes portadores de obesidade e controles e STAT3, cuja expressão parece estar aumentada em PBMC de indivíduos com obesidade. Serão necessárias novas análises por citometria de fluxo discriminando o nível de expressão para cada subtipo celular para obter uma resposta biológica confiável acerca da variação observada nos níveis de STAT3. Porém, observamos uma correlação entre a expressão gênica de STAT3 e o índice de massa corporal dos indivíduos estudados, o que nos fornece um forte indicio de que de fato a proteína STAT3 está alterada no contexto da obesidade (Figura suplementar 2).

A via PI3K/AKT participa da regulação da migração, sobrevivência, proliferação e da secreção de citocinas em macrófagos diante de diferentes estímulos metabólicos e inflamatórios. A ativação da via PI3K/AKT em macrófagos se dá diante da estimulação de receptores tipo toll (TLR) e é responsável por restringir sinais pró-inflamatórios e promover vias anti-inflamatórias, atuando na inibição da sinalização por TLR e da proteína pró-inflamatória NF- $\kappa$ B (VERGADI et al., 2017).

Já no contexto da obesidade, há evidências do papel da AKT na regulação do metabolismo energético, uma vez que o silenciamento dessa proteína em camundongos preveniu a obesidade induzida por dieta, bem como sua associação com a resistência insulínica na obesidade (WAN et al., 2012).

Porém, embora existam artigos demonstrando o papel da AKT1 no metabolismo e resistência insulínica diante da obesidade, bem como seu papel na regulação da resposta inflamatória em macrófagos, não encontramos trabalhos acerca do papel inflamatório de AKT1 na obesidade, o que o torna um alvo interessante para estudos futuros.

AKT1 se torna um alvo ainda mais promissor na compreensão do fenótipo imunossenesciente se consideramos que nossos resultados demonstram uma correlação positiva entre a expressão gênica de AKT1 e a idade dos indivíduos estudados (Figura suplementar 1). De fato, alguns estudos têm demonstrado o papel da ativação de AKT1 na indução da senescência celular em diferentes linhagens celulares através da indução da parada permanente do ciclo celular via P53/P21 (ASTLE et al., 2012; MIYAUCHI et al., 2004), importantes marcadores de senescência celular (SHARPLESS; SHERR, 2015).

Ainda, se partirmos do pressuposto de que os genes mais estritamente regulados, ou seja, com mais sítios de ligação para microRNAs, são os mais relevantes para a manutenção da homeostase celular e perscrutarmos a literatura em busca de seu papel biológico, encontramos informações bastante interessantes.

Um exemplo são as moléculas de adesão de células vasculares-1 (VCAM-1), as quais têm um papel bastante relevante no estabelecimento do fenótipo pró-inflamatório, tendo sua expressão induzida (juntamente com as moléculas de adesão intracelular-1, ICAM1) por uma importante molécula pró-inflamatória, o fator de necrose tumoral alpha ( $TNF\alpha$ ) (KONG et al., 2018), cujo aumento no tecido adiposo diante da obesidade foi descrito em camundongos ainda na década de 90 (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993). VCAM-1 foi inicialmente descrita por seu papel inflamatório através da indução da adesão vascular e migração de linhagens leucocitárias como macrófagos e linfócitos T da corrente sanguínea para outros tecidos, embora papeis variados como sua atividade na geração de ROS ou sua

associação com os processos de angiogênese e metástase tumoral venham sendo propostos (KONG et al., 2018).

Já a proteína de morte celular programada 4 (PCDC4 ou PDC4) é uma proteína pró-inflamatória capaz de promover a ativação de NF-kB e de suprimir a expressão da interleucina regulatória IL-10, conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias. Sheedy e colaboradores observaram uma redução na mortalidade de camundongos deficientes em PDCD4 após estímulo pró-inflamatório com lipopolissacarídeo (LPS) e que a indução de NFkB e IL-6 (SHEEDY et al., 2010), duas moléculas pró-inflamatórias muito importantes e já bem descritas na obesidade (FEBBRAIO, 2014), bem como a inibição de IL-10, são dependentes da expressão de PDCD4 (SHEEDY et al., 2010).

Um segundo estudo demonstra ainda que a depleção de PDCD4 em camundongos alimentados com dieta rica em gordura (HFD) apresentam um fenótipo não-obeso quando comparado ao grupo que expressa PDCD4, além de um aumento na sensibilidade a insulina e redução na infiltração de macrófagos e secreção de citocinas no tecido adiposo, demonstrando seu papel em consequências metabólicas e pró-inflamatórias observadas na obesidade (WANG et al., 2013).

A ciclo-oxigenase-2 (COX-2 ou PTGS2), por sua vez, parece ser bastante importante no estabelecimento da inflamação no tecido adiposo. Um estudo com ratos tratados com HFD e silenciamento de COX-2 no tecido adiposo, resultou em uma reversão da liberação elevada de citocinas pró-inflamatórias e da diminuição de adiponectina observados em ratos obesos, além da supressão da ativação transcricional de NF-kB. Além disso, a inibição de COX-2 reduz a quimiotaxia de adipócitos, comprometendo o recrutamento de macrófagos e linfócitos T por estas células. Esses resultados demonstram a importância de COX-2 para o recrutamento de células do sistema imune e para o estabelecimento do perfil pró-inflamatório observados em indivíduos com obesidade.

Porém, tão importante quanto encontrar proteínas envolvidas no fenótipo imunossenesciente na obesidade, é encontrar moléculas capazes de orquestrar e integrar diferentes vias de sinalização celular. Assim, realizamos uma busca por todos os microRNAs envolvidos na regulação dos genes previamente selecionados para os fenótipos imunossenescência ou *inflamm-aging* e selecionamos apenas aqueles centrais para a integração das diferentes proteínas seguindo a ideia de *hubs*, ou seja, moléculas que atuam como nodos centrais conectores em sistemas celulares complexos.

Fomos capazes de validar utilizando a técnica qRT-PCR com SYBR®Green e oligonucleotídeos iniciadores manualmente sintetizados dois dos microRNAs preditos como reguladores do *Inflamm-aging*: hsa-miR-214-3p e hsa-miR-374b-5p. Curiosamente, ao buscarmos na literatura através da base de artigos PubMed trabalhos envolvendo os 8 microRNAs resultantes das nossas análises, descobrimos que os únicos que fomos capazes de detectar por qRT-PCR são os mais descritos na literatura científica (Tabela suplementar 1), o que pode ser indicativo da sua relevância biológica ou maior facilidade de detecção por qRT-PCR. Porém, o mais interessante é que os microRNAs supracitados também foram pouco estudados para função imune ou mesmo detectados em PBMC, assim, aumento observado na expressão de hsa-miR-374b-5p apenas pontua a importância de ampliar os estudos envolvendo a expressão de microRNAs em diferentes patologias.

Um indício indireto do papel de hsa-miR-374b-5p na regulação do sistema imune é apresentado por *Hu et al.* (2015) em um estudo realizado abordando a nefropatia por IgA, uma doença autoimune associada à falência hepática, onde foi demonstrado que a inibição deste microRNA leva ao aumento na expressão da PTEN (proteína fosfatase homóloga à tensina) da chaperona COSMC (*core 1  $\beta$ GalT-specific molecular chaperone*), prevenindo a proliferação celular e a glicosilação aberrante de IgA1, responsável pelo estabelecimento desta nefropatia (HU et al., 2015).

Finalmente, miR-214-3p aparece na literatura associado à leucemia linfóide aguda de células T (T-ALL). O estudo em questão toma como ponto de partida uma abordagem semelhante a nossa: encontrar por técnicas de bioinformática microRNAs com potencial para regular a expressão de uma proteína importante para o estabelecimento da doença: *B-Cell Lymphoma/Leukemia 11B* (BCL11B). Observaram então, através de qRT-PCR, uma redução na expressão de miR-214-3p em PBMC de pacientes com T-ALL. Além disso, observaram uma correlação negativa significativamente relevante entre miR-214-3p e a proteína BCL11B em pacientes com T-ALL (HE et al., 2018).

Em relação aos demais microRNAs apontados como reguladores do fenótipo imunossenesciente nesse estudo, alguns já haviam sido descritos em PBMC em funções inflamatórias consistentes com a imunossenescência e outros estão muito pouco descritos ou foram estudados para condições completamente distintas.

Alguns dos microRNAs obtidos nas análises de bioinformática ainda foram muito pouco explorados em trabalhos acadêmicos, como é o caso de miR-3163 e miR-548d-3p, os quais são referidos em apenas 4 trabalhos na literatura (Tabela suplementar 1). Assim, considerando as evidências apresentadas neste trabalho apontando sua relevância na regulação de proteínas envolvidas nos fenótipos imunossenescência e *Inflamm-aging*, se faz de extrema importância que mais estudos explorando esses microRNAs sejam realizados com técnicas mais sensíveis, uma vez que utilizando a técnica qRT-PCR com SYBR®Green e oligonucleotídeos iniciadores manualmente sintetizados, não fomos capazes de detectá-los em PBMC.

O mesmo problema técnico ocorreu com os demais microRNAs, com exceção de miR-214 e miR-374. Porém, a maioria dos microRNAs restantes contém mais informações acerca de seu papel biológico do que miR-3163 e miR-548d-3p. Por exemplo, papéis diversos tem sido atribuídos a miR-369-3p, como sua atuação na supressão da migração e supressão celular via SRY-related HMG box transcription factor 4 (SOX4) nas linhagens celulares SH-SY5Y e 293T

*in vitro*, além de ter sido observado um aumento na expressão desse microRNA em amostras de tecido intestinal de pacientes com doença de Hirschsprung, uma doença que envolve a ausência de células ganglionares em porções intestinais (PAN et al., 2017). Outro trabalho demonstra ainda a ação de miR-369-3p na inibição da proliferação celular em câncer papilar de tireoide (LI; DONG; WANG, 2018). Porém, o que mais se aproxima do contexto apresentado neste trabalho ao propor miR-369-3p como um regulador metabólico é um estudo que demonstra a redução de sua expressão em PBMC no período pós-prandial seguindo uma refeição com alto teor de gorduras supersaturadas – estudo na qual miR-495-3p também aparece elevado (LOPEZ et al., 2018).

A mesma heterogeneidade funcional é observada nos demais microRNAs obtidos com as análises de bioinformática. Isso pode se dar pelo fato de que, embora sua descoberta tenha se dado em 1993, apenas com o passar do tempo passamos a direcionar maiores esforços para o estudo de microRNAs e a avaliação de seu real impacto na regulação de sistemas biológicos (VARANI, 2015).

Um outro achado interessante do presente estudo foi o aumento na expressão de miR-16-5p em PBMC de pacientes portadores de obesidade. MiR-16-5p é apontado na literatura como controle endógeno amplamente estável entre diferentes tecidos (LIANG et al., 2007), sendo comercialmente recomendado como normalizados e também para células do sistema imune como linfócitos T maduros (DROBNA et al., 2018). Porém, nossos resultados corroboram com outros estudos que propõe miR-16-5p como um microRNA importante no envelhecimento e na regulação da senescência celular. Frasca e colaboradores (2015), por exemplo, demonstram o aumento de miR-16 durante o envelhecimento e o apontam como um dos responsáveis pelo comprometimento funcional de células B nessa condição (FRASCA et al., 2015). Além disso, Kitadate e colaboradores (2015) demonstram que os níveis de expressão de miR-16 regulam o destino de células T em diferentes linfomas, levando-as à apoptose ou senescência celular.

Nesse modelo foi demonstrado que o aumento de miR-16 é responsável por induzir senescência celular via regulação de P21 (KITADATE et al., 2016).

Durante as análises de expressão de microRNAs por qRT-PCR encontramos algumas dificuldades metodológicas. Um dos grandes complicadores para o estudo de expressão de microRNAs é seu tamanho reduzido (aproximadamente 22 nt), o que exigiu o desenvolvimento de novas ferramentas para sua detecção. Uma das maiores modificações é a necessidade de iniciadores específicos para cada microRNA durante o processo de síntese de cDNA, o que adiciona um grau a mais de complexidade em sua detecção, uma vez que é muito difícil saber se, quando um produto amplifica, é um problema na eficiência da reação para o iniciador da síntese ou da reação de detecção por qRT-PCR. Além disso, alguns desses iniciadores parecem funcionar apenas quando incluídos isoladamente na reação, mesmo quando utilizada uma técnica padrão ouro (resultados preliminares, Figura suplementar 3), o que se torna um grande complicador quando existe uma limitação na quantidade de amostra biológica disponível.

As ferramentas de bioinformática utilizadas nesse estudo foram escolhidas afim de evitar a simplificação demasiada de uma abordagem geneticamente determinista. Tendo isso em mente, iniciamos este trabalho com uma busca por ensaios de microarranjo capazes de detectar centenas de diferentes genes e microRNAs potencialmente envolvidos com o comprometimento da homeostase observado em PBMC de indivíduos portadores de obesidade (KEUSTERMANS et al., 2017; SHERIDAN et al., 2012). Porém, ao longo do desenvolvimento da técnica, foram descobertos vieses bastante relevantes no estudo de genes e microRNAs em PBMC por microarranjos.

Primeiramente, é importante notar o quanto alterações na expressão gênica observadas em PBMC podem ser mais um artefato da alteração nas frequências das subpopulações celulares, representados por linfócitos B, linfócitos T, monócitos, macrófagos, matadoras naturais (NK), do que uma representação real do aumento de determinada proteína. De fato, análises de

citometria de fluxo realizadas neste trabalho demonstram um aumento na proporção celular de monócitos CD14<sup>+</sup> não acompanhado por um aumento no número de linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> (Figura 12). Assim, genes apontados como diferencialmente expressos poderiam apenas ser um reflexo do aumento relativo na quantidade de monócitos ou redução proporcional no número de linfócitos.

Por exemplo, se nosso objetivo fosse detectar a molécula de superfície CD14, marcador conhecido para monócitos, por microarranjo em uma população de PBMC e observássemos que a expressão dessa molécula aumenta de 20% para 50% em mononucleares de pacientes portadores de obesidade, poderíamos inferir erroneamente que linfócitos tiveram um aumento ou passaram a expressar a molécula CD14, quando na verdade, como pudemos observar, o que houve foi um aumento na proporção de monócitos entre PBMC de indivíduos obesos. Essas alterações poderiam ainda enganosamente diluir um efeito de aumento na expressão de um gene em uma população celular presente em menor proporção, o que poderia nos levar a ignorar genes biologicamente relevantes.

Além disso, trabalhos prévios do nosso grupo reforçaram a baixa representatividade e apontam problemas na reprodutibilidade de análises com microarranjo através da comparação entre três microarranjos gênicos distintos para PBMC em indivíduos portadores de obesidade, onde apenas um grupo muito pequeno de genes de mostrou consistentemente diferencialmente expresso entre os diferentes ensaios (Pierdoná, V., manuscrito em preparação).

Assim, uma alternativa para este problema teria sido uma busca pela literatura por genes já descritos por seu envolvimento com o fenótipo da imunossenescência, mas isso poderia nos levar a perder uma grande quantidade de informação descrita apenas indiretamente para este fenótipo e/ou apenas descrever novamente dados bem estabelecidos. Isso acabaria nos levando a ignorar uma série de informações pouco exploradas. Por exemplo, em 2018, Stoeger e colaboradores publicaram um estudo alarmante, afirmando que os esforços científicos hoje se

concentram em apenas 2.000 dos 19.000 genes descritos para o genoma humano. Mais do que isso, a maior parte dos genes estudados hoje são referentes a proteínas que já eram alvo de experimentação nas décadas de 80 e 90 por apresentarem características químicas e biológicas que facilitavam sua detecção. Isso nos sugere que, embora a humanidade tenha experimentado um avanço tecnológico significativo, permitindo a detecção de biomoléculas com precisão muito maior do que há 40 anos atrás, pesquisas recentes continuam focando nessas mesmas proteínas há muito conhecidas (STOEGER et al., 2018).

Tendo em vista a baixa representatividade dos microarranjos, bem como a baixa disponibilidade de microarranjos disponíveis para microRNAs e para evitar a perda de informação que poderia ocasionar de uma análise bibliográfica manual, passamos a buscar métodos alternativos para a obtenção de proteínas e microRNAs relevantes para o fenótipo imunossenesciente.

Para isso, passamos a utilizar uma ferramenta muito útil para análises mais abrangentes e que tem como premissa inicial não a doença ou o tipo celular, mas o fenótipo geral resultante de condição de forma independente do modelo celular estudado: a análise por ontologia.

Conforme supracitado, análises ontológicas não consideram tipo celular e, portanto, podem ser mais importantes em uma análise não-excludente, que visa encontrar novos alvos biologicamente relevantes em uma condição. Uma grande vantagem de se partir de uma análise baseada em fenótipos celulares é a premissa de que, sabendo que determinado grupo de proteínas está descrito para um fenótipo e encontrando estas como diferencialmente expressas em nosso modelo celular, temos uma forte evidência de que o fenótipo *a priori* selecionado para análise é de fato relevante para esse tipo celular na condição estudada.

Assim, em nossa abordagem, partimos não de genes descritos como diferencialmente expressos na obesidade, mas de fenômenos biológicos relevantes observados nessa condição:

um estado pró-inflamatório crônico e seus paralelos fisiológicos com o envelhecimento cronológico. Conforme mencionado anteriormente, nossas análises resultaram em uma lista de 334 proteínas descritas para o termo “Aging” e 966 incluídas no termo “*Inflammatory response*”. Com o intuito de selecionar moléculas potencialmente relevantes para os fenótipos imunossenescência e/ ou *Inflamm-aging*, passamos a trabalhar apenas com os genes incluídos na intersecção entre os dois termos ontológicos acima citados, ou seja, genes envolvidos simultaneamente com o envelhecimento e com a resposta inflamatória. Interessantemente, utilizando essa abordagem - sem nenhum filtro para o tipo celular ou a doença estudada - obtivemos uma lista bastante consistente, contendo diversos genes já descritos e validados pelo seu papel inflamatório em PBMC na obesidade. Porém, por ser uma abordagem sistemática, nos deparamos com uma série de genes não relatados no seu papel na obesidade e que poderiam ter sido ignorados em uma análise revisional tradicional da literatura.

Curiosamente, a grande maioria dos genes obtidos nessa análise já está de fato descrita em maior ou menor grau para no contexto da obesidade, o que ao mesmo tempo nos confirma a validade do modelo na busca por moléculas biologicamente relevantes e nos mostra que a obesidade parece de fator ser uma doença estudada principalmente pelo seu viés inflamatório. De fato, os processos pró-inflamatórios parecem ser tão relevantes para o estabelecimento e manutenção da obesidade, que o tecido adiposo tem sido proposto como um órgão imunológico nesta condição (GRANT; DIXIT, 2015).

Em relação à redução observada na viabilidade celular em PBMC de indivíduos portadores de obesidade, é importante mencionar que essa observação corrobora com resultados prévios do nosso grupo que apontam uma menor capacidade de lidar com estresse e recuperar danos ao DNA por comprometimento na sinalização de vias de reparo como a redução da fosforilação da histona *H2A histone family member X*, ou H2AFX ((PARISI et al., 2017, Parisi, M. M., manuscrito em produção).

Essa incapacidade de corrigir danos no DNA pode levar ao acúmulo excessivo de dano e a baixa capacidade de lidar com estresses que podem ser causados pelo isolamento de PMBC via gradiente de densidade ou congelamento em SFB com 10% DMSO, um reagente extremamente tóxico para as células quando em temperatura ambiente. Esses processos podem reduzir a viabilidade celular (RIEDHAMMER; HALBRITTER; WEISSERT, 2014), mas um perfil tão significativo de morte não é observado em PBMC de indivíduos eutróficos, corroborando com a ideia do comprometimento da capacidade da célula de responder a estresse na obesidade (PARISI et al., 2017).

Além disso, nossos resultados demonstram um aumento bastante elevado na proporção de monócitos CD14<sup>+</sup> em pacientes portadores de obesidade. De fato, a literatura relata alterações funcionais na medula óssea levando ao aumento de células progenitoras mieloides após dieta rica em gordura, além de uma potencialização do processo inflamatório em macrófagos derivados dessas progenitoras (SINGER et al., 2014). Um estudo por Liu, A., et al. (2018) demonstra ainda que esse predomínio da linhagem mielóide é notável após 6 semanas de dieta rica em gordura e é dependente do receptor tipo Toll 4 (TLR4) (LIU et al., 2018).

Por fim, podemos concluir que as proteínas e microRNAs propostos pelas análises de bioinformática como relevantes na regulação da imunossenescência estavam de fato alterados em PBMC de pacientes com obesidade, demonstrando a capacidade do nosso modelo de prever fenômenos biológicos relevantes. Além disso, pudemos observar a grande relevância da via AGE-RAGE em células mononucleares de sangue periférico de indivíduos portadores de obesidade e a alteração na expressão de hsa-miR-374b-5p nestes pacientes, enfatizando a importância de mais estudos acerca do papel regulatório desse e de outros microRNAs no contexto da obesidade.

## 7. PERSPECTIVAS

- 7.1. Avaliar a expressão dos demais microRNAs propostos como centrais na regulação dos fenótipos *imunossenescência e inflamm-aging*.
- 7.2. Investigar se a incubação de PBMC de um indivíduo saudável com um mimético de miR-374-5p (ou outro microRNA que eventualmente possa vir a ser descoberto como diferencialmente expressos em PBMC de indivíduos com obesidade) é capaz de induzir a ativação de RAGE e aumento da expressão gênica de STAT3, bem como um aumento no nível de fosforilação de NFkB e P38.
- 7.3. Investigar se a incubação de PBMC de indivíduo portador de obesidade com uma molécula antagonista de miR-374-5p (ou outro microRNA que eventualmente possa vir a ser descoberto como diferencialmente expressos em PBMC de indivíduos com obesidade) é capaz de reverter os efeitos observados nesse estudo.
- 7.4. Investigar se há comprometimento da resposta celular via RAGE incubando PBMC de indivíduos portadores de obesidade e controles a um agonista de RAGE (HMGB1) e analisar os níveis de expressão de RAGE em resposta a esse estímulo. A partir da amplitude das diferenças pré- e pós-estímulo, poderemos observar se houve ou não perda da sensibilidade de RAGE no contexto da obesidade.
- 7.5. Observar se houve indução do fenótipo senescente e SASP após incubação de PBMC de indivíduos portadores de obesidade e controles com HMGB1. A avaliação das citocinas envolvidas no SASP será realizada via *citometria de fluxo* e do fenótipo imunossenesciente através da avaliação do status proliferativo (via Ki-67), comprimento telomérico, níveis totais de espécies reativas de oxigênio (ROS) além da expressão de marcadores como CD28, CD57 e KLRG1 para linfócitos T e de miR-146a para macrófagos.

- 7.6.** Observar a expressão de RAGE e demais elementos da via em PBMC de um doador saudável quando incubadas com plasma de indivíduos portadores de obesidade ou controles, afim de investigar se a exposição ao ambiente celular alterado observado no contexto da obesidade é capaz de modular essa via.
- 7.7.** Quantificar a expressão de agonistas de RAGE, como HMGB1 e HSP70, no plasma de indivíduos portadores de obesidade e controles, afim de compreender se ativadores de RAGE estão presentes em maior quantidade no contexto da obesidade.
- 7.8.** Incubar PBMC de um indivíduo saudável com plasma de indivíduos portadores de obesidade ou controles, associado a um inibidor de RAGE e avaliar a expressão de RAGE e demais elementos da via, afim de compreender se a mudança de expressão dos elementos descritos para a via AGE-RAGE, caso observada, se dá de fato via ativação de RAGE. Investigar ainda se a presença do inibidor de RAGE é capaz de impedir o desenvolvimento do fenótipo imunossenesciente.

## 8. REFERÊNCIAS

ASHBURNER, Michael et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 25–29, 2000. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10802651>>. Acesso em: 8 fev. 2019.

ASTLE, M. V et al. AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. **Oncogene**, [s. l.], v. 31, n. 15, p. 1949–62, 2012. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21909130>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

CANCELLO, Raffaella et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. **Diabetes**, [s. l.], v. 54, n. 8, p. 2277–86, 2005. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16046292>>. Acesso em: 16 fev. 2019.

CHEN, C. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 33, n. 20, p. e179–e179, 2005. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16314309>>. Acesso em: 7 fev. 2019.

CHUAH, Yaw Kuang et al. Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. **International journal of inflammation**, [s. l.], v. 2013, p. 403460, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24102034>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

DE LA FUENTE, Monica; M. DE CASTRO, Nuria. Obesity as a Model of Premature Immunosenescence. **Current Immunology Reviews**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 63–75, 2012. Disponível em:

<<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1573-3955&volume=8&issue=1&spage=63>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

DENG, Tuo et al. Obesity, Inflammation, and Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 421–449, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27193454>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

DIVO, Miguel J.; MARTINEZ, Carlos H.; MANNINO, David M. Ageing and the epidemiology of multimorbidity. **The European respiratory journal**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 1055–68, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25142482>>. Acesso em: 28 mar. 2019.

DROBNA, Monika et al. Identification of Endogenous Control miRNAs for RT-qPCR in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 19, n. 10, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30241379>>. Acesso em: 25 fev. 2019.

FEBBRAIO, Mark A. Role of interleukins in obesity: implications for metabolic disease. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 312–319, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24698032>>. Acesso em: 11 fev. 2019.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, Alba et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 3117–32, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21686173>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

FRANCESCHI, C. et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 908, p. 244–54, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10911963>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

FRANCESCHI, Claudio et al. The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates. **Frontiers in Medicine**, [s. l.], v. 5, p. 61, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29662881>>. Acesso em: 6 fev. 2019.

FRASCA, Daniela et al. MicroRNAs miR-155 and miR-16 Decrease AID and E47 in B Cells

from Elderly Individuals. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 195, n. 5, p. 2134–2140, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26223652>>. Acesso em: 25 fev. 2019.

FULOP, Tamas et al. Immunosenescence and Inflamm-Aging As Two Sides of the Same Coin: Friends or Foes? **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 8, p. 1960, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29375577>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

GRANT, Ryan W.; DIXIT, Vishwa Deep. Adipose tissue as an immunological organ. **Obesity**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 512–518, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25612251>>. Acesso em: 5 fev. 2019.

GRUN, Lucas Kich et al. TRF1 as a major contributor for telomeres' shortening in the context of obesity. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 129, p. 286–295, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584918315521>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

GUNARATNE, Preethi H. et al. Large-Scale Integration of MicroRNA and Gene Expression Data for Identification of Enriched MicroRNA–mRNA Associations in Biological Systems. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l.: s.n.]. v. 667p. 297–315.

HE, Zifan et al. Downregulated miR-17, miR-29c, miR-92a and miR-214 may be related to BCL11B overexpression in T cell acute lymphoblastic leukemia. **Asia-Pacific journal of clinical oncology**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. e259–e265, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/ajco.12979>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678183>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

HUAN, Tianxiao et al. Age-associated microRNA expression in human peripheral blood is associated with all-cause mortality and age-related traits. **Aging cell**, [s. l.], v. 17, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29044988>>. Acesso em: 9 fev. 2019.

HULSMANS, Maarten et al. Decreased miR-181a Expression in Monocytes of Obese Patients Is Associated with the Occurrence of Metabolic Syndrome and Coronary Artery Disease. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s. l.], v. 97, n. 7, p. E1213–E1218, 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2012-1008>>. Acesso em: 9 fev. 2019.

JIANG, Minghong et al. Dysregulated expression of miR-146a contributes to age-related dysfunction of macrophages. **Aging Cell**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 29–40, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21981419>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

KAMBUROV, Atanas et al. ConsensusPathDB—a database for integrating human functional interaction networks. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 37, n. suppl\_1, p. D623–D628, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18940869>>. Acesso em: 8 fev. 2019.

KAMBUROV, Atanas et al. ConsensusPathDB: toward a more complete picture of cell biology. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 39, n. suppl\_1, p. D712–D717, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21071422>>. Acesso em: 8 fev. 2019.

**KEGG PATHWAY: AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications - Homo sapiens (human)**. [s.d.]. Disponível em: <[https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa04933](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04933)>. Acesso em: 25 fev. 2019.

**KEGG PATHWAY: C-type lectin receptor signaling pathway - Homo sapiens (human)**. [s.d.]. Disponível em: <[https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa04625+5599](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04625+5599)>. Acesso em: 25 fev. 2019.

**KEGG PATHWAY: TNF signaling pathway - Homo sapiens (human)**. [s.d.]. Disponível

em: <[https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa04668](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04668)>. Acesso em: 25 fev. 2019.

KEUSTERMANS, G. C. et al. Monocyte gene expression in childhood obesity is associated with obesity and complexity of atherosclerosis in adults. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 16826, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-17195-3>>. Acesso em: 10 fev. 2019.

KIM, Chulwoo et al. Activation of miR-21-Regulated Pathways in Immune Aging Selects against Signatures Characteristic of Memory T Cells. **Cell Reports**, [s. l.], v. 25, n. 8, p. 2148–2162.e5, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30463012>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

KITADATE, A. et al. MicroRNA-16 mediates the regulation of a senescence–apoptosis switch in cutaneous T-cell and other non-Hodgkin lymphomas. **Oncogene**, [s. l.], v. 35, n. 28, p. 3692–3704, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26640145>>. Acesso em: 25 fev. 2019.

KONG, Deok-Hoon et al. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 19, n. 4, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29614819>>. Acesso em: 10 fev. 2019.

KRAMER, Martha F. Stem-Loop RT-qPCR for miRNAs. **Current Protocols in Molecular Biology**, [s. l.], v. 95, n. 1, p. 15.10.1-15.10.15, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21732315>>. Acesso em: 7 fev. 2019.

LI, Guangjin et al. Decline in miR-181a expression with age impairs T cell receptor sensitivity by increasing DUSP6 activity. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 18, n. 10, p. 1518–1524, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23023500>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

LI, Peng; DONG, Mingqiang; WANG, Zhigang. Downregulation of TSPAN13 by miR-369-3p inhibits cell proliferation in papillary thyroid cancer (PTC). **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, [s. l.], 2018. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30114378>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

LI, Qi-Jing et al. miR-181a Is an Intrinsic Modulator of T Cell Sensitivity and Selection. **Cell**, [s. l.], v. 129, n. 1, p. 147–161, 2007. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17382377>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

LIANG, Yu et al. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 166, 2007. Disponível em:

<<http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-8-166>>. Acesso em: 25 fev. 2019.

LIU, Ailing et al. Bone marrow lympho-myeloid malfunction in obesity requires precursor cell-autonomous TLR4. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 708, 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41467-018-03145-8>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

LOPEZ, Sergio et al. A microRNA expression signature of the postprandial state in response to a high-saturated-fat challenge. **The Journal of nutritional biochemistry**, [s. l.], v. 57, p. 45–55, 2018. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095528631730712X>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

LUFT, Vivian C. et al. Chronic inflammation role in the obesity-diabetes association: a case-

cohort study. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 31, 2013. Disponível em: <<http://dmsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-5996-5-31>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

MARSEGLIA, Lucia et al. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 378–400, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25548896>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

MIN, Josine L. et al. Variability of gene expression profiles in human blood and lymphoblastoid cell lines. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 96, 2010. Disponível em: <<http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-11-96>>. Acesso em: 10 fev. 2019.

MIYAUCHI, Hideyuki et al. Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 212–220, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14713953>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

**multiMiR: Integration of multiple microRNA-target databases with their disease and drug associations version 1.4.0 from Bioconductor**. [s.d.]. Disponível em:

<<https://rdrr.io/bioc/multiMiR/>>. Acesso em: 8 fev. 2019.

NAYLOR, Keith et al. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 174, n. 11, p. 7446–52, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905594>>. Acesso em: 6 fev. 2019.

NOBLE, D. Genes and causation. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, [s. l.], v. 366, n. 1878, p. 3001–3015, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18559318>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

OHYASHIKI, Michiyo et al. Age-related decrease of miRNA-92a levels in human CD8+ T-cells correlates with a reduction of naïve T lymphocytes. **Immunity & ageing : I & A**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 11, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22082184>>.

Acesso em: 13 dez. 2018.

OISHI, Yumiko; MANABE, Ichiro. Macrophages in age-related chronic inflammatory diseases. **npj Aging and Mechanisms of Disease**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 16018, 2016.

Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/npjamd201618>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

OLIVIERI, Fabiola et al. Age-related differences in the expression of circulating microRNAs: miR-21 as a new circulating marker of inflammaging. **Mechanisms of Ageing and Development**, [s. l.], v. 133, n. 11–12, p. 675–685, 2012. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23041385>>. Acesso em: 7 fev. 2019.

OLIVIERI, Fabiola et al. MicroRNAs linking inflamm-aging, cellular senescence and cancer. **Ageing Research Reviews**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 1056–1068, 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23688930>>. Acesso em: 12 dez. 2018.

OLIVIERI, Fabiola et al. Age- and glycemia-related miR-126-3p levels in plasma and endothelial cells. **Ageing**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 771–786, 2014. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25324472>>. Acesso em: 8 fev. 2019.

ONG, Siew-Min et al. The pro-inflammatory phenotype of the human non-classical monocyte subset is attributed to senescence. **Cell Death & Disease**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 266, 2018.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29449647>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

PAN, Weikang et al. Upregulation of MiR-369-3p suppresses cell migration and proliferation by targeting SOX4 in Hirschsprung's disease. **Journal of Pediatric Surgery**, [s. l.], v. 52, n.

8, p. 1363–1370, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28412032>>.

Acesso em: 12 fev. 2019.

PARISI, M. M. et al. Immunosenescence Induced by Plasma from Individuals with Obesity Caused Cell Signaling Dysfunction and Inflammation. **Obesity**, [s. l.], v. 25, n. 9, 2017.

PEREIRA, Solange S.; ALVAREZ-LEITE, Jacqueline I. Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes. **Current Obesity Reports**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 422–431, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26626919>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

POIRIER, Paul et al. Obesity and Cardiovascular Disease: Pathophysiology, Evaluation, and Effect of Weight Loss. **Circulation**, [s. l.], v. 113, n. 6, p. 898–918, 2006. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.171016>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

RIEDHAMMER, Christine; HALBRITTER, Dagmar; WEISSERT, Robert. Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing, and Culture. In: [s.l.] : Humana Press, New York, NY, 2014. p. 53–61.

RU, Yuanbin et al. The multiMiR R package and database: integration of microRNA–target interactions along with their disease and drug associations. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 42, n. 17, p. e133–e133, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25063298>>. Acesso em: 8 fev. 2019.

RUPAIMOOLE, Rajesha; SLACK, Frank J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 203–222, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28209991>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

SHARPLESS, Norman E.; SHERR, Charles J. Forging a signature of in vivo senescence. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 397–408, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26105537>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

SHEEDY, Frederick J. et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the

proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 141–147, 2010. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19946272>>. Acesso em: 10 fev. 2019.

SHERIDAN, P. A. et al. Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. **International Journal of Obesity**, [s. l.], v. 36, n. 8, p. 1072–1077, 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ijo2011208>>. Acesso em: 10 fev. 2019.

SHIRAKAWA, Kohsuke et al. Obesity accelerates T cell senescence in murine visceral adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 126, n. 12, p. 4626–4639, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27820698>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

SINGER, Kanakadurga et al. Diet-induced obesity promotes myelopoiesis in hematopoietic stem cells. **Molecular metabolism**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 664–75, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25161889>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

STOEGER, Thomas et al. Large-scale investigation of the reasons why potentially important genes are ignored. **PLOS Biology**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. e2006643, 2018. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.2006643>>. Acesso em: 7 fev. 2019.

TCHKONIA, Tamara et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. **Aging Cell**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 667–684, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20701600>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 47, n. D1, p. D330–D338, 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D330/5160994>>. Acesso em: 8 fev. 2019.

VARANI, Gabriele. Twenty years of RNA: the discovery of microRNAs. **RNA (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 751–2, 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25780221>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

VERGADI, Eleni et al. Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 198, n. 3, p. 1006–1014, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28115590>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

WAN, Min et al. Loss of Akt1 in mice increases energy expenditure and protects against diet-induced obesity. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 96–106, 2012.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037765>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

WANG, Qun et al. Programmed cell death-4 deficiency prevents diet-induced obesity, adipose tissue inflammation, and insulin resistance. **Diabetes**, [s. l.], v. 62, n. 12, p. 4132–43, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23990362>>. Acesso em: 11 fev. 2019.

WEILNER, Sylvia et al. Secretion of microvesicular miRNAs in cellular and organismal aging. **Experimental Gerontology**, [s. l.], v. 48, n. 7, p. 626–633, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23283304>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

WHO. WHO | Obesity and overweight. **World Health Organisation Media Centre Fact Sheet No. 311**, [s. l.], 2011.

XU, Weili; LARBI, Anis. Markers of T Cell Senescence in Humans. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 1742, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28796199>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

ZHANG, Fangyuan; WANG, Degeng. The Pattern of microRNA Binding Site Distribution. **Genes**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 296, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29077021>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

## 9. LISTA DE FIGURAS

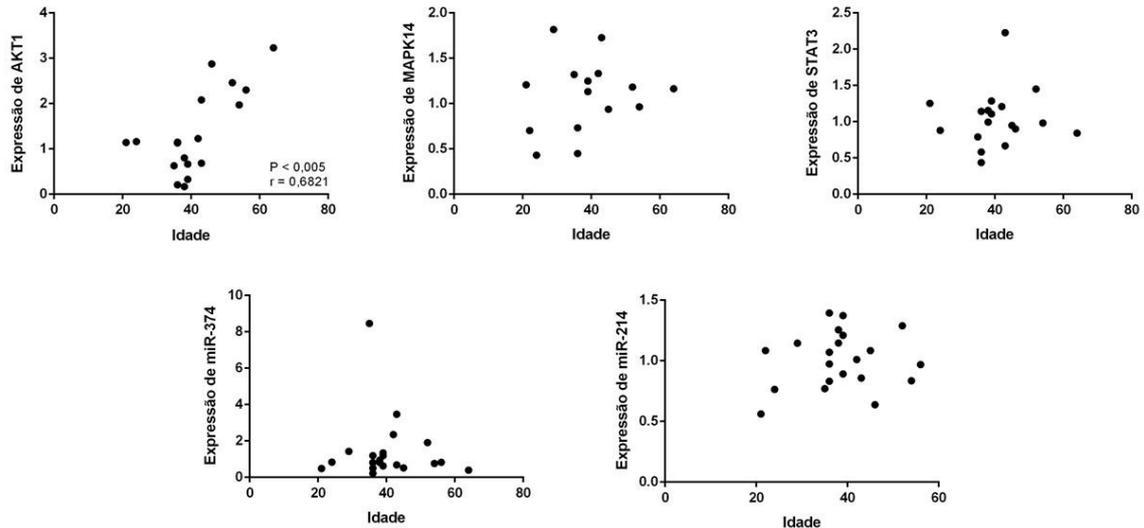
<b>Figura 1.</b> Caracterização dos fenótipos inflamm-aging e imunossenescência, sugerindo uma retroalimentação positiva e sobreposição entre ambos. ....	9
<b>Figura 2.</b> Diagrama de Venn incluindo os termos utilizados na análise ontológica. ....	24
<b>Figura 3.</b> Fluxograma do algoritmo desenvolvido para análise de busca por microRNAs complementares. ....	25
<b>Figura 4.</b> Modelo exemplificando o desenho de iniciadores específicos de síntese para o microRNA-214-3p. ....	26
<b>Figura 5.</b> Rede de interações ilustrando os 8 microRNAs capazes de realizar 18 ou mais interações e os 39 genes envolvidos no fenótipo Inflamm-aging por eles regulados. ....	38
<b>Figura 6.</b> Representação das 15 vias mais enriquecidas, obtidas a partir da análise de enriquecimento de via pelo software ConsensusPathDB, entre os genes descritos para o fenótipo <i>inflamm-aging</i> . ....	39
<b>Figura 7.</b> Via de sinalização AGE-RAGE, apontada como a via de sinalização mais enriquecida entre os genes do <i>Inflamm-aging</i> ( $P = 1,14e-12$ ) pelo software <i>ConsensusPathDB</i> . ....	40
<b>Figura 8.</b> Aumento da expressão gênica de STAT3 em PBMC de pacientes portadores de obesidade (casos) ( $P = 0,0369$ ) e níveis similares de MAPK14 e AKT1 entre os grupos. ....	41
<b>Figura 9.</b> Aumento da expressão de RAGE em PBMC de indivíduos portadores de obesidade avaliada por citometria de fluxo. ....	43
<b>Figura 10.</b> Sinalização aumentada de NF-kB e P38 em indivíduos portadores de obesidade. ....	44
<b>Figura 11.</b> Redução da viabilidade celular em PBMC de indivíduos portadores de obesidade .....	45

<b>Figura 12.</b> Aumento na proporção de monócitos (CD14+) em indivíduos portadores de obesidade.....	46
<b>Figura 13.</b> Curva de dissociação utilizando diferentes iniciadores em concentrações variadas para detecção de microRNAs específicos .....	47
<b>Figura 14.</b> Curva de dissociação utilizando diferentes iniciadores para o microRNA-214 (A) e microRNA-374 (B) em diferentes concentrações de amostra. ....	48
<b>Figura 15.</b> Curva de dissociação dos diferentes iniciadores para os microRNAs A) U6, B) RNU6 e C) miR-16-5p e D) aumento na expressão de miR-16 normalizado para U6 em PBMC de pacientes portadores de obesidade .....	50
<b>Figura 16.</b> A) Aumento na expressão do hsa-miR-374b-5p em pacientes portadores de obesidade (P = 0,0386) e B) nível de expressão similar de hsa-miR-214-3p entre os grupos. ....	51

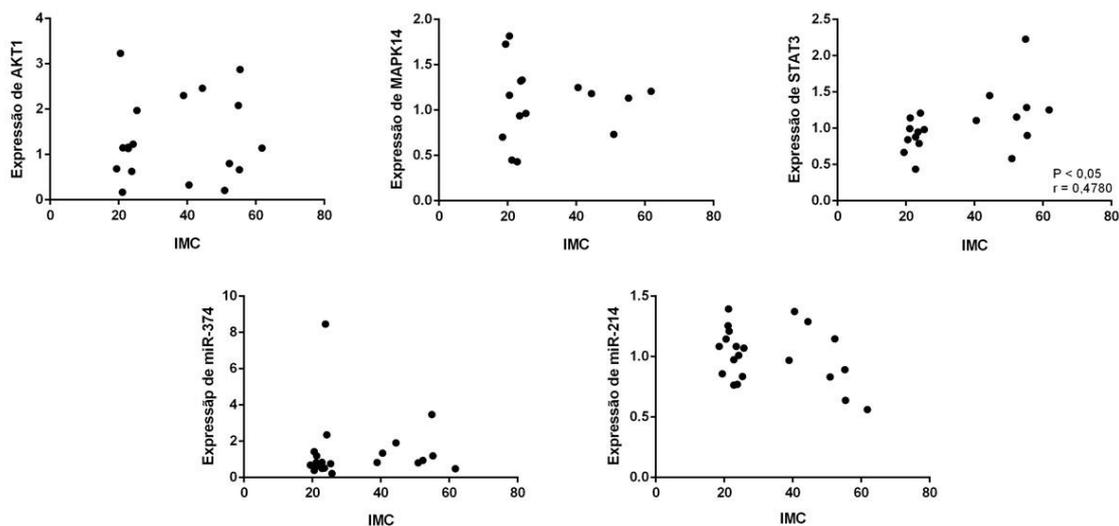
## 10. LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizado para síntese e expressão de genes e microRNAs. ....	27
<b>Tabela 2.</b> Relação de temperatura de anelamento e concentração final de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos experimentos de qRT-PCR. ....	30
<b>Tabela 3.</b> Dados demográficos. ....	33
<b>Tabela 4.</b> Relação e descrição dos microarranjos encontrados na busca por microRNAs identificados em pacientes portadores de obesidade. ....	35
<b>Tabela 5.</b> Representação dos 8 microRNAs centrais capazes de realizar 18 ou mais interações entre os 39 genes envolvidos no fenótipo inflamm-aging. ....	36

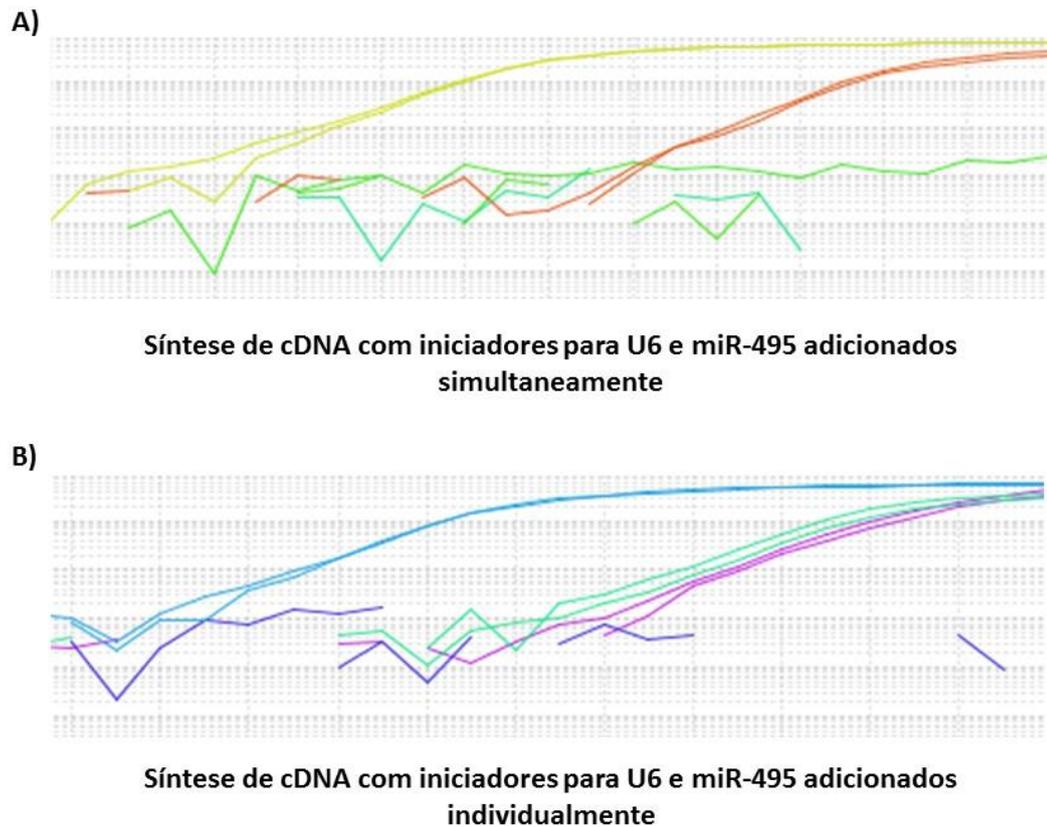
## MATERIAL SUPLEMENTAR



**Figura suplementar 1.** Correlação positiva entre a expressão gênica de AKT1 e idade cronológica. Não foram observadas correlações entre idade e os demais genes da via AGE-RAGE ou microRNAs-374 e -214. Os testes de normalidade foram realizados utilizando o teste Shapiro-Wilk e os coeficientes de correlação foram analisados pelo coeficiente de correlação de Pearson para dados paramétricos ou coeficiente de correlação de postos de Spearman para dados não-paramétricos. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P \leq 0,005$ ;  $r$  = coeficiente de correlação.



**Figura suplementar 2.** Correlação positiva entre a expressão gênica de STAT3 e IMC. Não foram observadas correlações entre IMC e os demais genes da via AGE-RAGE ou microRNAs-374 e -214. Os testes de normalidade foram realizados utilizando o teste Shapiro-Wilk e os coeficientes de correlação foram analisados pelo coeficiente de correlação de Pearson para dados paramétricos ou coeficiente de correlação de postos de Spearman para dados não-paramétricos. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P \leq 0,05$ ;  $r$  = coeficiente de correlação.



**Figura suplementar 3.** Amplificação por qRT-PCR a partir de duas sínteses independentes: A) Utilizando oligonucleotídeos iniciadores para síntese de U6 e miR-495 simultaneamente, no mesmo tubo de reação. U6: amarelo (5ng de amostra) e vermelho (controle negativo); miR-495: tons de verde; A) Utilizando oligonucleotídeos iniciadores para síntese de U6 e miR-495 independentemente, em diferentes tubos de reação. U6: azul claro (5ng de amostra) e verde (controle negativo); miR-495: lilás (5ng de amostra) e azul escuro (controle negativo). Temperatura de anelamento 60°C para ambas as reações.

**Tabela suplementar 1.** Número de artigos obtidos na busca pelos microRNAs centrais descritos nesse trabalho na base de dados online PubMed.

MicroRNAs	Nº de resultados	Em mononucleares?
miR-214-3p	61	Sim
miR-374-5p	42	Não
miR-369-3p	15	Sim
miR-520f	15	Não
miR-495-3p	12	Sim
miR-548c-3p	11	Não
miR-548d-3p	4	Não
miR-3163	4	Não

## **11. ANEXOS**

### **11.1. Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)**

Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo para conhecer melhor sobre o quanto o sobrepeso afeta medidas de envelhecimento celular em pessoas com obesidade de grau III (obesos mórbidos) submetidos à cirurgia bariátrica no período transoperatório e em voluntários saudáveis.

A obesidade mórbida – ou obesidade de grau III – definida pelo  $IMC \geq 40$ , é uma grave condição crônica de saúde que não tem uma causa única. Dentre os efeitos nocivos, a obesidade tem sido associada ao maior risco de desenvolver doenças como diabetes, hipertensão e câncer, afetando substancialmente a qualidade de vida do portador, além de possuírem uma expectativa de vida reduzida.

Apesar da importância de sabermos quais são os efeitos da obesidade, ainda são poucos os estudos que avaliaram esses efeitos sobre medidas genéticas de envelhecimento celular.

O conhecimento dos efeitos da obesidade mórbida sobre a degradação do DNA durante o processo de envelhecimento celular pode trazer amplos benefícios em termos de saúde pública, no que diz respeito à criação de medidas que objetivem evitar e controlar o excessivo aumento de peso da população em geral, visando à prevenção de diversas doenças associadas à obesidade.

Antes de consentir com sua participação, solicitamos que você leia as informações contidas neste termo de consentimento.

#### **1. QUAL É OBJETIVO PRINCIPAL DO ESTUDO?**

O objetivo principal deste estudo é avaliar os efeitos da obesidade mórbida durante o processo de envelhecimento em uma população de obesos mórbidos submetidos à cirurgia bariátrica, no período transoperatório, e indivíduos saudáveis.

## 2. COMO O ESTUDO SERÁ REALIZADO E QUAL SERÁ A MINHA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO?

O paciente, ou responsável legal serão convidados a responder perguntas que revisam aspectos clínicos, sociais e de saúde, do paciente e de seus familiares. Os pacientes serão convidados a responder a dois questionários relacionados à qualidade de vida relacionada à saúde e ambiente familiar (Questionário de Qualidade de Vida-SF-36 e Questionário FACES III).

Esses questionários serão realizados por um entrevistador. Após o preenchimento dos questionários, será solicitada aos pacientes a permissão para a coleta de uma amostra de esfregaço de células da bochecha interna da boca (mucosa oral) e coleta de 1 ml de sangue do seu braço (sangue periférico). As coletas serão realizadas por uma equipe treinada no período transoperatório.

## 3. QUAIS SÃO OS RISCOS E BENEFÍCIOS DO ESTUDO?

Ao participar do nosso estudo você pode auxiliar os pesquisadores a melhorar os conhecimentos sobre a obesidade no Brasil, trazendo benefícios para a prevenção e cuidados para saúde. Estimamos um desconforto mínimo no momento da punção venosa para retirada de sangue ou do esfregaço da bochecha para a obtenção de células da mucosa interna da boca. Não prevemos maiores riscos associados a ditos procedimentos.

## 4. QUEM TERÁ ACESSO ÀS INFORMAÇÕES DESTE ESTUDO?

Os dados dos questionários e os resultados individuais dos estudos de obesidade são confidenciais e não poderão ser utilizadas para outros objetivos que não estejam descritos neste termo. Os resultados deste estudo deverão ser publicados, porém a identidade dos participantes não será revelada em nenhum momento. As amostras biológicas serão armazenadas apenas com seu registro, sem o nome ou iniciais. Somente os pesquisadores poderão identificar a origem

das amostras. Os Comitês de Ética e Pesquisa da PUCRS ou da UFRGS poderão ter acesso aos dados da pesquisa para poder assegurar que seus direitos estão sendo protegidos.

#### 5. QUAIS SÃO AS COMPENSAÇÕES DA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO?

Não haverá custos para os participantes do estudo. Você também não receberá nenhum pagamento pela participação no trabalho.

#### 6. PODEREI DESISTIR DE PARTICIPAR DO ESTUDO?

Os participantes podem em qualquer momento cancelar sua participação no estudo. Isto não influenciará o andamento do estudo e seus resultados futuramente, nem o tratamento oferecido pela equipe responsável.

#### 7. A QUEM DEVO ME DIRIGIR PARA MAIORES INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA?

Se você tiver qualquer dúvida sobre seus direitos como participante do estudo, você pode ligar e contatar os responsáveis pelo estudo no telefone (51) 3308 5763 e falar com Lucas Grun ou a Dra. Florencia Barbé-Tuana. Também pode entrar em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa da UFRGS (51) 3308 3738 ou PUCRS (51) 3320 3345), e contatar os coordenadores Profs. Marcelo Lazzaron Lamers e Wania Aparecida Partata, ou o Prof. Rodolfo Herberto Schneider, respectivamente.

Favor preencher abaixo se concordar em participar do estudo:

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado (a) dos objetivos desta pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre todos os procedimentos que serão feitos e os possíveis desconfortos, riscos e benefícios associados. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e sei que poderei solicitar novas informações a

qualquer momento. Além disso, sei que as informações obtidas durante o estudo são confidenciais e privadas, e que poderei me retirar do estudo a qualquer momento.

### ASSINATURAS

Sua assinatura abaixo demonstra que você recebeu e leu este termo, entendeu todas as informações relacionadas ao estudo proposto, esclareceu suas dúvidas e concordou com a sua participação em nosso estudo.

\_\_\_\_\_

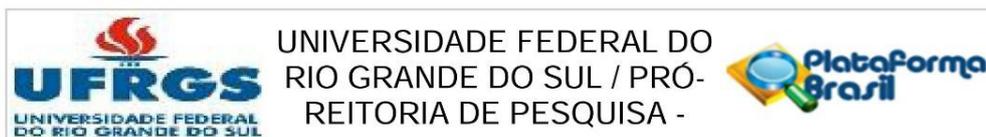
Nome do paciente (ou responsável)

Se responsável: ( ) mãe ( ) pai ( ) outros: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Contatos: ( ) \_\_\_\_\_

Assinatura ( ) \_\_\_\_\_

## 11.2. Anexo 2 – Parecer aprovado pelo CEP da UFRGS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Determinação do comprimento de telômeros em diferentes populações celulares de obesos mórbidos

**Pesquisador:** Fatima Theresinha Costa Rodrigues Guma

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 26793114.0.0000.5347

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciências Básicas da

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 640.817

**Data da Relatoria:** 20/03/2014

#### Apresentação do Projeto:

A obesidade é uma desordem definida pelo índice de massa corporal (IMC), relacionada diretamente com a porcentagem de gordura corporal total. Além de contribuir para o surgimento de desequilíbrios metabólicos, a obesidade acelera os processos celulares do envelhecimento, reduzindo a expectativa de vida. Este estudo, no contexto de uma dissertação de mestrado, avaliará o tamanho de telômeros em indivíduos obesos.

#### Objetivo da Pesquisa:

O presente projeto visa agregar aos estudos com indivíduos obesos dados sobre o encurtamento dos telômeros.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios adequadamente apresentados.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

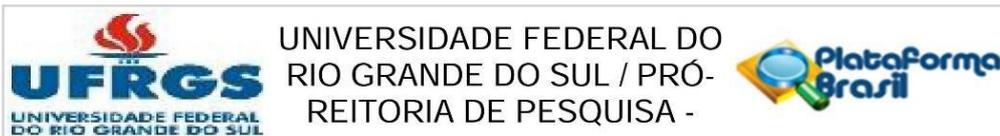
Possui mérito.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE apresentado adequadamente

Concordância do ambulatório de Cirurgia Bariátrica do Hospital São Lucas da PUCRS presente.

**Endereço:** Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
**Bairro:** Farroupilha **CEP:** 90.040-060  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 640.817

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto adequado e não apresentando pendências

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado

PORTO ALEGRE, 08 de Maio de 2014

---

**Assinador por:**  
**MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
**Bairro:** Farroupilha **CEP:** 90.040-060  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propeq.ufrgs.br

Página 02 de 02

### 11.3. Anexo 3 – Parecer aprovado pelo CEP da PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE  
CATÓLICA DO RIO GRANDE  
DO SUL - PUC/RS



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação do comprimento dos telômeros em pacientes obesos com indicação de tratamento cirúrgico e sua evolução após a cirurgia bariátrica

**Pesquisador:** Alexandre Vontobel Padoin

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 29576014.4.1001.5336

**Instituição Proponente:** UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

**Patrocinador Principal:** Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 760.537

**Data da Relatoria:** 31/08/2014

##### Apresentação do Projeto:

Sem ressalvas.

##### Objetivo da Pesquisa:

Sem ressalvas.

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem ressalvas.

##### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem ressalvas.

##### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sem ressalvas.

##### Recomendações:

Recomenda-se que o endereço do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS seja atualizado no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

Av. Ipiranga 6681, Prédio 40 - Sala 505

Porto Alegre /RS - Brasil - CEP: 90619-900

Fone/Fax: (51) 3320.3345

**Endereço:** Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505

**Bairro:** Partenon

**CEP:** 90.619-900

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3320-3345

**Fax:** (51)3320-3345

**E-mail:** cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE  
CATÓLICA DO RIO GRANDE  
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 760.537

E-mail: cep@pucls.br

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências foram atendidas.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

PORTO ALEGRE, 21 de Agosto de 2014

---

**Assinado por:**  
**Rodolfo Herberto Schneider**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505  
**Bairro:** Partenon **CEP:** 90.619-900  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucls.br

**11.4.** Anexo 4 – QR Code e link de acesso para o navegador para a rede de interações contendo 8 microRNAs propostos como nodos centrais para os fenótipos imunossenesciente e *inflamm-aging*, bem como dos 39 genes por eles regulados.



[https://drive.google.com/open?id=1wcyRTTMrSw8-zAdWSx\\_rn05WdJtdg74L](https://drive.google.com/open?id=1wcyRTTMrSw8-zAdWSx_rn05WdJtdg74L)

**11.5.** Anexo 5 - QR Code e link de acesso para o navegador para a via de sinalização AGE-RAGE adaptada a partir da base de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEEG) com destaque à direita para os 8 microRNAs-chave , juntamente com seus respectivos alvos proteicos (destacados também em azul na via).



[https://drive.google.com/open?id=1m-\\_y9VPIHwa5dVPvnCfAQV9-D8L2U7Cp](https://drive.google.com/open?id=1m-_y9VPIHwa5dVPvnCfAQV9-D8L2U7Cp)

## 11.6. Anexo 6 - Resumos em congressos

1. **LAVANDOSKI, P.;** PIERDONÁ, V. ; GUMA, F. T. C. R. ; BARBE-TUANA, F. M. . Enrichment pathway analysis and microRNA expression profile involved in premature ageing and inflammation in peripheral blood mononuclear cells from obese patients. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
  
2. **LAVANDOSKI, P.;** PIERDONÁ, V. ; GUMA, F. T. C. R. ; BARBE-TUANA, F. M. . Evaluation Of Expression And Interaction Of Micrnas Described For Ageing And Inflammation In Peripheral Blood Mononuclear Cells From Obese Patients. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
  
3. **LAVANDOSKI, PATRÍCIA;** PARISI, M. M. ; GRUN, L. K. ; ALVES, L. B. ; BRISTOT, I. J. ; MATTIELLO, R. ; MOTTIN, C. C. ; KLAMT, F. ; JONES, M. H. ; PADOIN, A. V. ; GUMA, F. T. C. R. ; BARBE-TUANA, F. M. . Immunosenescence Induced by Plasma From Individuals With Obesity Caused Cell Signaling Dysfunction and Inflammation. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

### 11.7. Anexo 7 – Artigos publicados

1. PICARELLI, MARIA MERCEDES ; DANZMANN, LUIZ CLÁUDIO ; GRUN, LUCAS KICH ; JÚNIOR, NEVTON TEIXEIRA ROSA ; **LAVANDOVSKY, PATRÍCIA** ; GUMA, FÁTIMA THERESINHA COSTA RODRIGUES ; STEIN, RENATO T. ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA ; JONES, MARCUS HERBERT . Arterial stiffness by oscillometric device and telomere length in juvenile idiopathic arthritis with no cardiovascular risk factors: a cross-sectional study. *Pediatric Rheumatology JCR*, v. 15, p. PMC5418721, 2017.
2. PARISI, MARIANA MIGLIORINI ; GRUN, LUCAS KICH ; **LAVANDOSKI, PATRÍCIA** ; ALVES, LETÍCIA BISCAINO ; BRISTOT, IVI JULIANA ; MATTIELLO, RITA ; MOTTIN, CLÁUDIO CORÁ ; KLAMT, FÁBIO ; JONES, MARCUS HERBERT ; PADOIN, ALEXANDRE VONTOBEL ; GUMA, FÁTIMA COSTA RODRIGUES ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA MARÍA . Immunosenescence induced by plasma from individuals with obesity caused cell signaling dysfunction and inflammation. *Obesity JCR*, v. 25, p. 1523-1531, 2017.
3. GRUN, LUCAS KICH ; TEIXEIRA, NEVTON DA ROSA ; MENGDEN, LÚCIA VON ; DE BASTIANI, MARCO ANTÔNIO ; PARISI, MARIANA MIGLIORINI ; BORTOLIN, RAFAEL ; **LAVANDOSKI, PATRÍCIA** ; PIERDONÁ, VINÍCIUS ; ALVES, LETÍCIA BISCAINO ; MOREIRA, JOSÉ CLÁUDIO FONSECA ; MOTTIN, CLÁUDIO CORÁ ; JONES, MARCUS HERBERT ; KLAMT, FÁBIO ; PADOIN, ALEXANDRE VONTOBEL ; GUMA, FÁTIMA COSTA RODRIGUES ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA MARÍA . TRF1 AS A MAJOR CONTRIBUTOR FOR

TELOMERES` SHORTENING IN THE CONTEXT OF OBESITY. FREE RADICAL  
BIOLOGY AND MEDICINE **JCR**, 2018.

### **11.8. Anexo 8 – Premiação em congresso**

1. Menção honrosa durante a XXXII reunião anual da FeSBE, em 2017, pelo trabalho intitulado “Immunosenescence induced by plasma from individuals with obesity caused cell signaling dysfunction and inflammation”.