

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

Dissertação de Mestrado

MAYARA SOUZA DE OLIVEIRA

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES *UCP2*, *NLRP3* E DO MICRORNA-133a NO
TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO DE PACIENTES COM OBESIDADE E
INDIVÍDUOS EUTRÓFICOS**

Porto Alegre, dezembro de 2018

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES *UCP2*, *NLRP3* E DO MICRORNA-133a
NO TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO DE PACIENTES COM OBESIDADE E
INDIVÍDUOS EUTRÓFICOS**

Mayara Souza de Oliveira

Orientadora: Prof.^a Dra. Bianca Marmontel de Souza

Coorientadora: Prof.^a Dra. Daisy Crispim Moreira

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de mestre.

CIP - Catalogação na Publicação

Souza de Oliveira, Mayara
ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES UCP2, NLRP3 E DO
MICRORNA-133a NO TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO DE
PACIENTES COM OBESIDADE E INDIVÍDUOS EUTRÓFICOS /
Mayara Souza de Oliveira. -- 2018.
64 f.
Orientadora: Bianca Marmontel de Souza.

Coorientadora: Daisy Crispim Moreira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Obesidade. 2. Proteína desacopladora 2. 3.
Inflamassoma NLRP3. 4. MicroRNA. I. Marmontel de
Souza, Bianca, orient. II. Crispim Moreira, Daisy,
coorient. III. Título.

Dedico este trabalho às minhas orientadoras,
colegas de trabalho e em especial à minha família.

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”.

(Antoine de Saint-Exupéry)

AGRADECIMENTOS

Jamais teria conseguido chegar aonde cheguei sem a ajuda de muitas pessoas importantes, logo, gostaria de fazer alguns agradecimentos.

Primeiramente à minha família, meu pai Angelo, minha mãe Cleusa e minha irmã Alice, pelo carinho, compreensão, amor e apoio neste período.

Ao meu amado Thiago, por estar presente me apoiando em cada alegria e também nas dificuldades, por ser sempre meu ponto de equilíbrio e paz.

À minha orientadora Dra. Bianca Marmontel de Souza por ter aceitado essa grande aventura de me orientar. Obrigada pela imensa dedicação, paciência e pelas palavras de incentivo sempre ditas com muito carinho. Me sinto privilegiada por ter sido sua primeira aluna de mestrado e poder acompanhar a evolução de uma grande orientadora. Sei que estamos prontas para os próximos desafios que o doutorado trará.

À minha coorientadora Dra. Daisy Crispim, pela grande oportunidade de receber seus ensinamentos, confiança, dedicação e importantes contribuições.

Aos meus melhores amigos nessa jornada, Pamela Nique e Felipe Pellenz por todas as risadas, alegrias, lanches na copa, momentos tensos e grandes parcerias. A vida acadêmica pode ser pesada e cansativa, mas vocês fizeram os meus dias mais leves e eu sou imensamente grata por isso.

Às queridas alunas de iniciação científica Michelle Rodrigues e Elis Rossoni pela imensa ajuda e por terem me ensinado muito mais do que eu as ensinei.

Aos meus colegas de laboratório pela convivência, momentos de descontração e conhecimento compartilhado, em especial à Denise Sortica e Poliana Correia.

À CAPES e HCPA-FIPE pelo apoio financeiro.

Muito obrigada a todos que de alguma maneira tornaram tudo isso possível.

Esta dissertação de mestrado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo apresentada na forma de uma breve introdução geral sobre o assunto da dissertação e na sequência será apresentado o artigo original. Após, serão apresentadas as considerações finais.

Artigo original: Obesity is associated with a downregulation of *UCP2* and miR-133a-3p but not *NLRP3* in subcutaneous adipose tissue

LISTA DE ABREVIATURAS PARA O REFERENCIAL TEÓRICO

ASC	<i>Inflammasome Adaptor Protein Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing CARD</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern molecule</i>
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EROs	Espécies reativas de oxigênio
IMC	Índice de massa corporal
IL-18	Interleucina 18
IL-1 β	Interleucina-1 beta
LAGB	<i>Laparoscopic adjustable gastric banding</i>
miRNA	MicroRNA
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NLRP3	<i>NLR family pyrin domain containing 3</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern molecule</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPAR- α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
PPAR- γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SREBP-1c	<i>Sterol regulatory element-binding protein 1</i>
TA	Tecido adiposo
TAS	Tecido adiposo subcutâneo
TAV	Tecido adiposo visceral

THP1	Linhagem humana de monócitos leucêmicos
TLR	<i>Toll like receptors</i>
UCP	<i>Uncoupling proteins</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>

LISTA DE ABREVIATURAS PARA O ARTIGO ORIGINAL

<i>ACTB</i>	Beta-actin
AT	Adipose tissue
<i>β2M</i>	Beta-2-Microglobulin
BMI	Body mass index
BP	Blood pressure
DAMP	Danger associated molecular pattern
DXA	Dual energy absorptiometry X-ray
FFA	Fatty free acid
FFM	Fat free mass
FPG	Fast plasma glucose
HbA1c	Glycated hemoglobin
HDL	High density lipoprotein
HOMA-IR	Homeostasis model assessment index
IL-18	Interleucine-18
IL-1β	Interleucine-1 beta
IR	Insulin resistance
LDL	Low density lipoprotein
miRNA	MicroRNA
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3
Pre-DM	Pre-diabetes
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction

REE	Resting energy expenditure
ROS	Reactive oxygen species
RYGB	Roux-en-Y gastric bypass
SAT	Subcutaneous adipose tissue
STROBE	Strengthening the reporting of observational studies in epidemiology
T2DM	Type 2 diabetes mellitus
THP1	Human cell line of leukemic monocytes
UCP	Uncoupling protein
UTR	Untranslated region
VAT	Visceral adipose tissue

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
CAPÍTULO 1.....	17
REFERENCIAL TEÓRICO	17
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Obesidade.....	18
1.2 A proteína desacopladora 2 (UCP2) e a obesidade.....	19
1.3 O inflamassoma NLRP3 e a obesidade.....	21
1.4 MicroRNA 133a-3p como regulador da expressão da <i>UCP2</i> e do <i>NLRP3</i>	26
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVO	30
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
CAPÍTULO 2 – ARTIGO ORIGINAL	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS	62

RESUMO

A obesidade é uma doença crônica multifatorial caracterizada por um acúmulo excessivo de gordura corporal resultante de um desequilíbrio energético entre a ingestão e o gasto calórico. Esse desequilíbrio é decorrente da interação entre meio ambiente, suscetibilidade genética e epigenética.

A UCP2 (*uncoupling protein 2*) está localizada na membrana mitocondrial interna e atua dissipando o gradiente de prótons da cadeia respiratória mitocondrial, diminuindo a produção de ATP e, conseqüentemente, influenciando o gasto energético. Alguns estudos sugerem que a expressão de UCP2 está diminuída no tecido adiposo (TA) de indivíduos com obesidade; entretanto, os resultados são ainda inconclusivos. Além disso, a UCP2 parece regular a ativação do inflamassoma NLRP3 (*NLR family, pyrin domain-containing 3*). O inflamassoma NLRP3 é um dos principais responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias [interleucina- (IL-1 β) e IL-18] no TA e está envolvido na inflamação crônica de baixo grau presente na obesidade. Dessa forma, ambos os genes podem contribuir para a patogênese dessa doença.

Diversos estudos vêm demonstrando a associação de fatores epigenéticos reguladores da expressão gênica, como os microRNAs (miRNAs), em diversos processos patológicos, incluindo na patogênese da obesidade. Estudos recentes *in vitro* e em modelos animais sugerem que o miR-133a-3p regula a expressão de UCP2 em diferentes tecidos. Além disso, o miR-133a-3p parece também estar envolvido na ativação do inflamassoma NLRP3 através do bloqueio de UCP2, mostrando o envolvimento deste miRNA na regulação desses dois genes. Entretanto, até o momento, nenhum estudo avaliou de forma combinada a associação de UCP2, NLRP3 e miR-133a-3p no contexto da obesidade.

Sendo assim, no presente estudo, nós comparamos as expressões de *UCP2*, *NLRP3* e miR-133a-3p no TA subcutâneo (TAS) de pacientes com obesidade e indivíduos eutróficos. Além disso, avaliamos se essas expressões se correlacionavam com parâmetros de composição corporal, taxa metabólica basal, resistência à insulina e perfis glicêmico e lipídico desses indivíduos.

Neste estudo de caso-controle, as expressões dos genes de interesse foram avaliadas no TAS de 61 pacientes, os quais foram divididos em três grupos de acordo com os seus índices de massa corporal (IMC): Grupo 1 ($IMC \leq 25 \text{kg/m}^2$; n = 8), Grupo 2 ($IMC: 30.0 - 39.9 \text{ kg/m}^2$; n = 24) e Grupo 3 ($IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$; n = 29) por meio da técnica de PCR em tempo real. Para este fim, utilizamos biópsias de indivíduos submetidos à cirurgia abdominal eletiva (grupos 1 e 2) ou cirurgia bariátrica (grupo 3).

Como resultado, encontrou-se uma diminuição das expressões de *UCP2* e miR-133a-3p em pacientes com obesidade (Grupos 2 e 3) em comparação com indivíduos eutróficos (Grupo 1). Apesar da expressão de *NLRP3* não ter diferido entre os grupos, ela se correlacionou negativamente com a expressão de *UCP2* e positivamente com a expressão de miR-133a-3p, com valores de circunferência da cintura e de excesso de peso.

Em conclusão, as expressões de *UCP2* e miR-133a-3p estão diminuídas no TAS de pacientes com obesidade. Embora a expressão de *NLRP3* não tenha diferido entre os grupos, ela foi positivamente correlacionada com os valores de circunferência da cintura e excesso de peso. Estes resultados reforçam os papéis da *UCP2*, *NLRP3* e miR-133a-3p na fisiopatologia da obesidade.

ABSTRACT

Obesity is a chronic multifactorial disease characterized by an excessive accumulation of body fat resulting from an energy imbalance between intake and caloric expenditure. This imbalance is due to the interaction between environment, genetic susceptibility and epigenetics.

The uncoupling protein 2 (UCP2) is located in the inner mitochondrial membrane and acts by dissipating the proton gradient from the mitochondrial respiratory chain, decreasing ATP production and, consequently, influencing energy expenditure. Some studies have suggested that *UCP2* expression is decreased in adipose tissue (TA) from obese individuals; however, results are still inconclusive. In addition, UCP2 seems to regulate the activation of the NLR family, pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome. The inflammasome NLRP3 is one of the main responsible for the production of the proinflammatory cytokines interleukin- (IL-1 β) and IL- 18 in the TA and seems to be involved in the chronic low-grade inflammation present in obesity. Thus, both of these genes can contribute to the pathogenesis of this disease.

Several studies have demonstrated the association of epigenetic factors that regulate gene expression, such as microRNAs (miRNAs), in several pathological processes, including in the pathogenesis of obesity. Recent studies in vitro and in animal models have suggested that miR-133a-3p regulates *UCP2* expression in different tissues. Moreover, miR-133a-3p also appears to be involved in the activation of NLRP3 inflammation by blocking *UCP2*, showing the involvement of this miRNA in the regulation of these two genes. However, to date, no study has evaluated the combined association of *UCP2*, *NLRP3* and miR-133a-3p in the context of obesity.

Thus, in the present study, we compared the expressions of *UCP2*, *NLRP3* and miR-133a-3p in subcutaneous AT (SAT) of patients with obesity and eutrophic

individuals. In addition, we evaluated whether their expressions correlate with parameters of body composition, resting energy expenditure, insulin resistance, and glycemic and lipid profiles of these individuals.

In this case-control study, expressions of the genes of interest were evaluated in SAT of 61 patients, which were divided into three groups according to body mass index (BMI): Group 1 (BMI \leq 25 kg /m²); Group 2 (BMI: 30.0 - 39.9 kg /m², n = 24); and Group 3 (BMI \geq 40 kg /m²; n = 29) using Real Time PCR. For this purpose, we used biopsies of individuals submitted to elective abdominal surgery (groups 1 and 2) or bariatric surgery (group 3).

As a result, *UCP2* and miR-133a-3p expressions were decreased in patients with obesity (Group 2 and 3) compared to eutrophic individuals (Group 1). Although *NLRP3* expression did not differ among groups, it was negatively correlated with *UCP2* expression and positively correlated with miR-133a-3p expression, waist circumference and weigh excess.

In conclusion, *UCP2* and miR-133a-3p expressions are decreased in SAT of patients with obesity. Although *NLRP3* expression did not differ among groups, it was positively correlated with waist circumference and weigh excess values. These results reinforce the roles of *UCP2*, *NLRP3* and miR-133a-3p-3p in the physiopathology of obesity.

CAPÍTULO 1

REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

A obesidade é uma doença crônica multifatorial caracterizada por um acúmulo excessivo de gordura corporal resultante de um desequilíbrio energético entre a ingestão e o gasto calórico, afetando a saúde e reduzindo a qualidade e expectativa de vida dos indivíduos afetados (1, 2). O índice de massa corporal (IMC), calculado pela divisão do peso de uma pessoa (em Kg) pelo quadrado da sua altura (em metros), é o parâmetro mais utilizado para avaliar a adiposidade geral dos indivíduos em ambos os sexos. A ocorrência de sobrepeso em adultos é definida pelo IMC entre 25 e 29,9 Kg/m² e obesidade pelo IMC \geq a 30 Kg/m² (3).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a prevalência de obesidade praticamente triplicou nas últimas décadas. Em 2016, mais de 1,9 bilhões de adultos estavam com sobrepeso, sendo que, destes mais de 650 milhões tinham obesidade (13% da população acima de 18 anos). Ainda, cerca de 2,8 milhões de pessoas morrem a cada ano devido ao sobrepeso e obesidade (3). No Brasil, a prevalência de obesidade é estimada em 18,9%, sendo a prevalência em Porto Alegre de 19% (4). Além disso, esse aumento está associado com aumento da morbimortalidade e risco aumentado para outras doenças crônicas, como o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares, distúrbios musculoesqueléticos e alguns tipos de cânceres (1).

A obesidade é decorrente da complexa interação entre meio ambiente, suscetibilidade genética e epigenética (2). O aumento na sua prevalência pode ser atribuído a diversas mudanças sociais e ambientais, as quais incluem hábitos alimentares inadequados, sedentarismo, fatores emocionais, urbanização e acesso socioeconômico dependente a uma dieta saudável (1). Além disso, estudos em gêmeos

monozigóticos demonstraram que 50-70% da variância fenotípica dos valores do IMC pode ser explicada por fatores genéticos (5). Adicionalmente, alterações induzidas pela epigenética na expressão gênica emergiram como uma forma alternativa na qual os fatores ambientais podem influenciar a obesidade (1).

1.2 A proteína desacopladora 2 (UCP2) e a obesidade

As mitocôndrias estão localizadas no citoplasma de todas as células eucarióticas e estão envolvidas em diversos processos vitais para a célula, tais como produção de energia, controle redox, homeostase de cálcio e certas rotas metabólicas e de biossíntese, através da capacidade de produzir ATP e controlar a degradação de substratos [revisado em (6, 7)].

Proteínas desacopladoras (*uncoupling proteins* - UCPs) estão presentes na membrana mitocondrial interna e fazem parte de uma superfamília de proteínas transportadoras (8). A proteína UCP2 foi descoberta em 1997 por Fleury *et al.* (9) e possui uma distribuição tecidual bastante ampla, sendo expressa no tecido adiposo (TA) branco e marrom, hipotálamo, músculo esquelético, macrófagos, entre outros [revisado em (6, 10)].

Estudos demonstraram que através do transporte de prótons do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial, a UCP2 desacopla a oxidação dos substratos da síntese de ATP, dissipando a energia do potencial de membrana e, conseqüentemente, diminuindo a produção de ATP pela cadeia respiratória mitocondrial (**Figura 1**). Esse desacoplamento está associado a funções tecido-específicas como controle da ingestão alimentar, regulação do gasto energético e do metabolismo de ácidos graxos livres, regulação negativa da secreção de insulina pelas células-beta pancreáticas, diminuição da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs),

de *UCP2* (14). Após a adição de ácidos graxos livres ao meio de cultura, a expressão de *UCP2* também mostrou-se aumentada em linhagens celulares derivadas do fígado e células-beta pancreáticas (14). Além disso, a *UCP2* parece atuar no transporte direto de ácidos graxos, quando há um excesso destes dentro da mitocôndria, protegendo as células do dano causado pela peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados [revisado em (15)].

Estudos em humanos sugerem uma diminuição da expressão de *UCP2* em TA subcutâneo (TAS) e omental de adultos com obesidade em comparação com controles eutróficos (16, 17). De acordo com isso, também foi observada a redução de *UCP2* no TAS de crianças com obesidade (18). No entanto, outros estudos não encontraram diferenças na expressão de *UCP2* em TA de indivíduos com obesidade em relação aos indivíduos eutróficos, mostrando que o papel da *UCP2* na obesidade ainda é controverso (19, 20).

De Oliveira *et al.* observaram um aumento da expressão de *UCP2* em TAS de pacientes 6 meses após a cirurgia bariátrica em comparação com o período pré-operatório, sugerindo que este aumento de *UCP2* está associado a um maior gasto energético, podendo prever a perda de peso após a cirurgia (21). Corroborando com esses achados, Heinitz *et al.*, mostraram que pacientes com expressão reduzida de *UCP2* no músculo esquelético tiveram uma maior redução do gasto energético durante o período de restrição calórica e perderam menos peso (22), reforçando a importância do papel da *UCP2* na obesidade.

1.3 O inflamassoma NLRP3 e a obesidade

O TA é o principal local de armazenamento do excesso de energia, na forma de triglicerídeos. O crescimento massivo no número e tamanho dos adipócitos contribui

para um estado de inflamação crônica de baixo grau, uma característica da obesidade. Essa inflamação está associada à produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias (23).

Evidências sugerem que o inflamassoma NLRP3 (*NLR family pyrin domain containing 3*) é um regulador chave da inflamação metabólica, possuindo um papel importante na patogênese da obesidade através da produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 no TA (23-25).

O NLRP3 possui a capacidade de reconhecer uma variedade de sinais de perigo, como padrões moleculares associados a patógenos- ou a danos- (PAMPs ou DAMPs). Os DAMPs incluem moléculas associadas à obesidade, tais como, ácidos graxos livres, glicose, EROS e ceramidas, que podem ativar o complexo inflamassoma. Esse complexo multiproteico é composto pela proteína NLR (*nucleotide-binding domain, leucine rich containing*), pela ASC (*adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein containing CARD*) e pela enzima caspase-1 e pode ser ativado por meio de dois sinais. O primeiro sinal, dado através da ativação de NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) no núcleo, irá gerar NLRP3, pró-IL-1 β e pró-IL-18 inativos via receptores do tipo Toll (TLRs) (26). O segundo sinal, através de EROs e ruptura lisossômica, entre outros, facilitará a oligomerização do NLRP3 inativo com as proteína ASC e procaspase-1, formando o inflamassoma NLRP3:ASC:caspase-1 ativo, o qual irá então clivar as citocinas inativas pró-IL-1 β e pró-IL-18, transformando-as em citocinas ativas IL-1 β e IL-18 (27) (**Figura 2**).

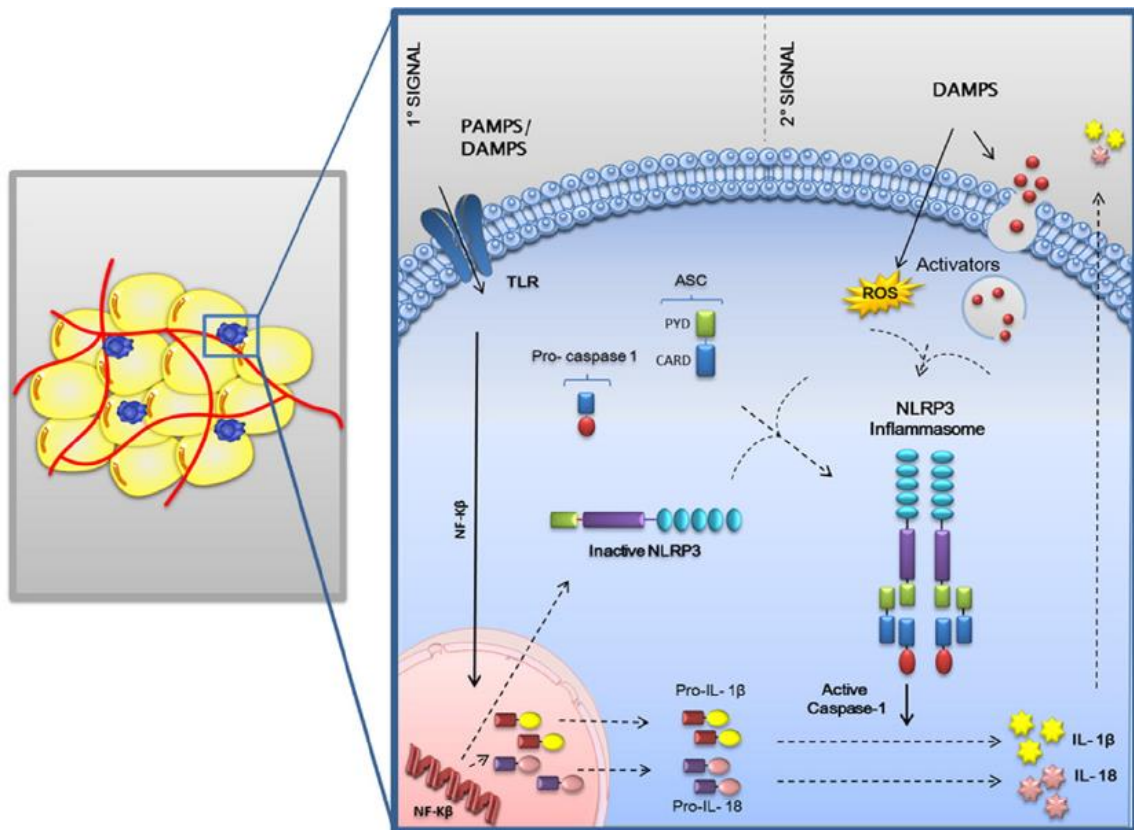


Figura 2. Ativação do inflamassoma NLRP3. Dois sinais são necessários para ativação deste complexo. Em pacientes obesos, macrófagos presentes no tecido adiposo são ativados por exposição a PAMPs ou DAMPs, agindo principalmente através de receptores TLRs. Este primeiro sinal ativa NF-κB no núcleo, levando à transcrição de NLRP3 inativo, pro-IL-1β e pro-IL-18, que, após a tradução, permanecem no citoplasma em suas formas inativas. O segundo sinal, que inclui a geração de EROs e a ruptura lisossômica, entre outros, ativa o inflamassoma NLRP3, facilitando a oligomerização do NLRP3 inativo, a proteína ASC e a procaspase-1. Este complexo ativado, por sua vez, catalisa a conversão da procaspase-1 a caspase-1, que promoverá a conversão de pró-IL-1β em IL-1β e pró-IL-18 em IL-18. Retirado e adaptado de Rheinheimer *et al.* (28).

Uma revisão sistemática realizada recentemente pelo nosso grupo investigou a associação do NLRP3 com obesidade e resistência à insulina. Interessantemente, a maior parte dos estudos em humanos demonstrou um aumento da expressão do *NLRP3*

em TA de indivíduos com obesidade em comparação aos indivíduos magros (**Tabela 1**) (28).

Tabela 1: Estudos que avaliaram a associação entre a expressão do NLRP3 e obesidade em humanos.

1º autor, ano (Ref.)	Amostra	Tecido	Resultados
Bando, 2015 (29)	Pacientes que implantaram um dispositivo cardíaco	TAS	↑ NLRP3 em pacientes com obesidade, dislipidemia e/ou DM. NLRP3 correlacionou-se com IMC (+) e adiponectina (-)
Esser, 2013 (30)	Indivíduos com obesidade metabolicamente não saudáveis, indivíduos com obesidade metabolicamente saudáveis e indivíduos eutróficos	TAS/TA V	↑ NLRP3 em TAV de indivíduos com obesidade metabolicamente não saudáveis vs. metabolicamente saudáveis e eutróficos; NLRP3 correlacionou-se com resistência à insulina (+)
Goossens, 2012 (31)	Pacientes com obesidade vs. indivíduos eutróficos	SAT	-- NLRP3 foi similar entre os grupos
Kursawe, 2016 (32)	Adolescentes com obesidade	TAS	↑ NLRP3 em TAS de adolescentes com alta razão VAT/VAT + SAT vs. grupo de baixa razão
Moschen, 2011 (33)	Pacientes com obesidade grave (antes e depois de LAGB)	TAS/TA V/ fígado	-- NLRP3 não foi afetado pela perda de peso
Serena, 2016	Indivíduos com	Células	↑ NLRP3 em células tronco

(34)	obesidade vs. indivíduos eutróficos	tronco derivadas de adipócitos de indivíduos com obesidade e/ou de DM2 vs. indivíduos eutróficos	adipócitos
			s
Vandanmagsar, 2011 (35)	Pacientes com obesidade e DM2 (antes e 1 ano após a perda de peso)	TAS	↓ NLRP3 em TAS de pacientes com DM2 após perda de peso, que foi associada com melhora na sensibilidade à insulina
Yin, 2014 (36)	Mulheres eutróficas vs. mulheres com obesidade	TAS	↑ NLRP3 em TAS de mulheres com obesidade vs. mulheres eutróficas

TAS, tecido adiposo subcutâneo; TAV, tecido adiposo visceral; IMC, índice de massa corporal; DM, diabetes mellitus; DM2, diabetes mellitus tipo 2; LAGB, *Laparoscopic adjustable gastric banding*. Retirado e adaptado de Rheinheimer *et al.* (28).

Interessantemente, há poucos estudos descrevendo o papel da UCP2 na ativação do inflamassoma NLRP3 (37-39). Estudos realizados em astrócitos e macrófagos de camundongos demonstraram que a deficiência de *Ucp2* acentua a produção de EROs e também agrava a inflamação através da ativação do inflamassoma, mostrando a relevância da produção de EROs como DAMP para a ativação do NLRP3 (37-39). Por outro lado, a superexpressão de *UCP2* em macrófagos humanos e de camundongos aumentou significativamente a expressão de *NLRP3* e a sua deficiência ou inibição diminuiu a expressão de *NLRP3*; sugerindo que a *UCP2*, pelo menos em parte, pode também ativar o inflamassoma NLRP3 através da inibição da via de síntese lipídica ou pelo seu papel de influência na fagocitose (40, 41).

1.4 MicroRNA 133a-3p como regulador da expressão da *UCP2* e do *NLRP3*

Os microRNAs (miRNAs) são moléculas de RNA fita simples (19–25 nucleotídeos) não codificadores de proteínas, que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais (42). Os miRNAs exercem seus efeitos regulatórios ligando-se aos seus genes ou RNAm alvos, clivando-os e resultando em instabilidade e degradação destes RNAs ou em inibição da tradução (Figura 3). Além disso, o impacto funcional dessa ligação irá depender do grau de complementariedade entre a “seed sequence” (2-8 pares de bases) do miRNA e o RNAm alvo. Dessa forma, este mecanismo permite a redução dos níveis das proteínas de seus genes-alvo, raramente afetando o nível de expressão transcricional (42).

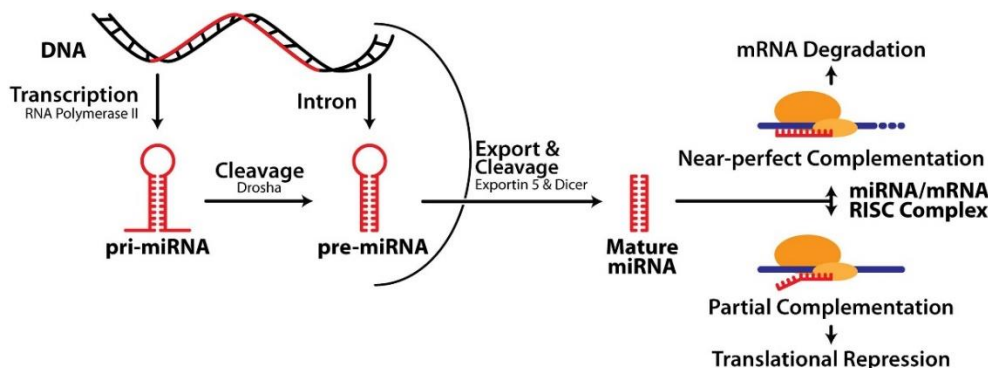


Figura 3. Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs. A biogênese do miRNA consiste em três processos principais: transcrição de um transcrito primário maior (pri-miRNA), seguido por duas clivagens consecutivas feitas pelas enzimas RNases II, Drosha e Dicer, que irão gerar um miRNA precursor (pré-miRNA) e por fim, a liberação do miRNA maduro. Retirado e adaptado de Ryan *et al.* (43).

Existem evidências de que alterações na expressão de miRNAs possam estar envolvidas em diversos processos patológicos, incluindo na patogênese da obesidade

[revisado em (44, 45)]. O miR-133a-3p foi inicialmente classificado como um miRNA específico de miócitos (“*myomiR*”) e cardiomiócitos (46). Além disso, estudos sugerem que este miR pode ter papel na fibrose tecidual, sepse, desenvolvimento de cânceres, inflamação e resistência à insulina (47-49).

O miR-133a-3p já foi avaliado no TA em modelos animais, onde o bloqueio duplo de miR-133a1 e miR-133a2 em camundongos promoveu a expressão de genes relacionados à termogênese e o *browning* no TAS. Além disso, camundongos *knockout* para miR133a1^{-/-}a2^{+/-} tiveram uma maior sensibilidade à insulina e tolerância à glicose em comparação aos animais selvagens (50). De acordo com este achado, a administração de reversina (um inibidor do miR-133a) em camundongos, induziu o *browning* no TAV e atenuou o ganho de peso induzido por dieta rica em gordura, através do aumento da termogênese (51).

Apesar de o miR-133a-3p-3p ainda não ter sido estudado em humanos no contexto da obesidade, ele parece estar envolvido na regulação da *UCP2* e do *NLRP3* (52-54). Alguns estudos *in vitro* e em modelos animais verificaram que o miR-133a-3p regula a expressão de *UCP2* em diferentes tecidos, tais como, músculo esquelético e cardíaco, macrófagos, entre outros (53, 55-57). Um estudo em modelo murino de doença inflamatória intestinal demonstrou que tanto bloquear a *UCP2* (com siRNA) ou aumentar a expressão do miR-133a-3p-1 foram capazes de aliviar a severidade da doença. Além disso, estas modificações também alteraram marcadores de inflamação, estresse oxidativo e metabolismo energético (55).

Bandyopadhyay *et al.* (53) demonstraram o envolvimento do miR-133a-3p na supressão do inflamassoma NLRP3 por meio da diminuição da expressão de *UCP2*. Esses autores relataram que a transfecção de uma linhagem de monócitos humanos (THP1) com o miR-133a-3p-1 diminuiu a expressão de *UCP2*. Além disso, mostraram

que a supressão de *UCP2* aumentou a ativação do inflamassoma, enquanto que a sua superexpressão diminuiu esta ativação (53), mostrando o envolvimento deste miRNA na regulação desses dois genes.

2 JUSTIFICATIVA

Devido ao aumento da epidemia da obesidade, novas alternativas têm-se tornado necessárias para o tratamento dessa doença. Além disso, as comorbidades associadas à obesidade, como o DM2 e danos cardiovasculares, bem como a própria obesidade, comprometem a qualidade de vida e a produtividade dos pacientes gerando grandes custos ao sistema de saúde.

Estudos indicam que a UCP2 parece ter um importante papel na regulação do gasto energético, enquanto que o inflamassoma NLRP3 parece estar envolvido na inflamação crônica de baixo grau presente na obesidade. Dessa forma, ambos poderiam estar contribuindo para a patogênese dessa doença.

Além disso, mais recentemente, as alterações epigenéticas na expressão gênica, através dos miRNAs, emergiram como um caminho alternativo no qual os fatores ambientais podem influenciar no fenótipo da obesidade, tornando-se um amplo caminho a ser pesquisado. Nesse contexto, avaliar a função de miRNAs na regulação de genes envolvidos com o gasto energético e inflamação, presentes na obesidade, é fundamental para uma melhor compreensão da patogênese dessa doença.

Até o momento, poucos estudos avaliaram a expressão de *UCP2* e de *NLRP3* em TAS de indivíduos obesos e eutróficos, com resultados contraditórios. Além disso, nenhum estudo avaliou a expressão do miR-133a-1 e sua relação com a *UCP2* e o *NLRP3* e obesidade.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar as expressões de *UCP2*, *NLRP3* e do miR-133a-3p no tecido adiposo subcutâneo de pacientes com diferentes graus de obesidade e de indivíduos eutróficos.

3.2 Objetivos Específicos

1. Comparar as expressões de *UCP2*, *NLRP3* e do miR-133a-3p no tecido adiposo subcutâneo de pacientes com diferentes graus de obesidade e de indivíduos eutróficos;

2. Correlacionar os níveis de expressão de *UCP2*, *NLRP3* e do miR-133a-3p com características clínicas e laboratoriais relacionadas à obesidade nesses pacientes;

3. Avaliar se as expressões de *UCP2*, *NLRP3* e miR-133a-3p se correlacionam entre si.

REFERÊNCIAS

1. Pigeyre M, Yazdi FT, Kaur Y, Meyre D. Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. *Clin Sci (Lond)*. 2016;130(12):943-86.
2. Smith KB, Smith MS. Obesity Statistics. *Primary care*. 2016;43(1):121-35, ix.
3. World Health Organization. 2018;Fact Sheet [cited 2018 March 08].
4. Sistema de vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL) - Ministério da Saúde. 2017.
5. Allison DB, Kaprio J, Korkeila M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1996;20(6):501-6.
6. Souza BM, Assmann TS, Kliemann LM, Gross JL, Canani LH, Crispim D. The role of uncoupling protein 2 (UCP2) on the development of type 2 diabetes mellitus and its chronic complications. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2011;55(4):239-48.
7. Donadelli M, Dando I, Fiorini C, Palmieri M. UCP2, a mitochondrial protein regulated at multiple levels. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(7):1171-90.
8. Ruiz-Ramirez A, Lopez-Acosta O, Barrios-Maya MA, El-Hafidi M. Cell Death and Heart Failure in Obesity: Role of Uncoupling Proteins. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:9340654.
9. Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, et al. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet*. 1997;15(3):269-72.
10. Toda C, Diano S. Mitochondrial UCP2 in the central regulation of metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2014;28(5):757-64.
11. Krauss S, Zhang CY, Lowell BB. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(3):248-61.
12. Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Levi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, et al. Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(12):8705-12.
13. Thompson MP, Kim D. Links between fatty acids and expression of UCP2 and UCP3 mRNAs. *FEBS Lett*. 2004;568(1-3):4-9.
14. Reilly JM, Thompson MP. Dietary fatty acids Up-regulate the expression of UCP2 in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;277(3):541-5.
15. Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(6):755-67.
16. Mahadik SR, Lele RD, Saranath D, Seth A, Parikh V. Uncoupling protein-2 (UCP2) gene expression in subcutaneous and omental adipose tissue of Asian Indians: Relationship to adiponectin and parameters of metabolic syndrome. *Adipocyte*. 2012;1(2):101-7.

17. Oberkofler H, Liu YM, Esterbauer H, Hell E, Krempler F, Patsch W. Uncoupling protein-2 gene: reduced mRNA expression in intraperitoneal adipose tissue of obese humans. *Diabetologia*. 1998;41(8):940-6.
18. Zamora-Mendoza R, Rosas-Vargas H, Ramos-Cervantes MT, Garcia-Zuniga P, Perez-Lorenzana H, Mendoza-Lorenzo P, et al. Dysregulation of mitochondrial function and biogenesis modulators in adipose tissue of obese children. *Int J Obes (Lond)*. 2018;42(4):618-24.
19. Millet L, Vidal H, Andreelli F, Larrouy D, Riou JP, Ricquier D, et al. Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(11):2665-70.
20. Vidal-Puig A, Rosenbaum M, Considine RC, Leibel RL, Dohm GL, Lowell BB. Effects of obesity and stable weight reduction on UCP2 and UCP3 gene expression in humans. *Obesity research*. 1999;7(2):133-40.
21. de Oliveira BAP, de Souza Pinhel MA, Nicoletti CF, de Oliveira CC, Quinhoneiro DCG, Noronha NY, et al. UCP2 and PLIN1 Expression Affects the Resting Metabolic Rate and Weight Loss on Obese Patients. *Obesity surgery*. 2017;27(2):343-8.
22. Heinitz S, Piaggi P, Yang S, Bonfiglio S, Steel J, Krakoff J, et al. Response of skeletal muscle UCP2-expression during metabolic adaptation to caloric restriction. *Int J Obes (Lond)*. 2018;42(5):974-84.
23. Ralston JC, Lyons CL, Kennedy EB, Kirwan AM, Roche HM. Fatty Acids and NLRP3 Inflammasome-Mediated Inflammation in Metabolic Tissues. *Annual review of nutrition*. 2017;37:77-102.
24. Haneklaus M, O'Neill LA. NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation. *Immunological reviews*. 2015;265(1):53-62.
25. Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, El Hadri K, Friguet B, Simmet T, et al. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox biology*. 2015;4:296-307.
26. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *Journal of immunology*. 2009;183(2):787-91.
27. Hughes MM, O'Neill LAJ. Metabolic regulation of NLRP3. *Immunological reviews*. 2018;281(1):88-98.
28. Rheinheimer J, de Souza BM, Cardoso NS, Bauer AC, Crispim D. Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: A systematic review. *Metabolism: clinical and experimental*. 2017;74:1-9.
29. Bando S, Fukuda D, Soeki T, Nishimoto S, Uematsu E, Matsuura T, et al. Expression of NLRP3 in subcutaneous adipose tissue is associated with coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2015;242(2):407-14.
30. Esser N, L'Homme L, De Roover A, Kohnen L, Scheen AJ, Moutschen M, et al. Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue. *Diabetologia*. 2013;56(11):2487-97.
31. Goossens GH, Blaak EE, Theunissen R, Duijvestijn AM, Clement K, Tervaert JW, et al. Expression of NLRP3 inflammasome and T cell population markers in adipose tissue are associated with insulin resistance and impaired glucose metabolism in humans. *Molecular immunology*. 2012;50(3):142-9.

32. Kursawe R, Dixit VD, Scherer PE, Santoro N, Narayan D, Gordillo R, et al. A Role of the Inflammasome in the Low Storage Capacity of the Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue in Obese Adolescents. *Diabetes*. 2016;65(3):610-8.
33. Moschen AR, Molnar C, Enrich B, Geiger S, Ebenbichler CF, Tilg H. Adipose and liver expression of interleukin (IL)-1 family members in morbid obesity and effects of weight loss. *Molecular medicine*. 2011;17(7-8):840-5.
34. Serena C, Keiran N, Ceperuelo-Mallafre V, Ejarque M, Fradera R, Roche K, et al. Obesity and Type 2 Diabetes Alters the Immune Properties of Human Adipose Derived Stem Cells. *Stem cells*. 2016;34(10):2559-73.
35. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature medicine*. 2011;17(2):179-88.
36. Yin Z, Deng T, Peterson LE, Yu R, Lin J, Hamilton DJ, et al. Transcriptome analysis of human adipocytes implicates the NOD-like receptor pathway in obesity-induced adipose inflammation. *Molecular and cellular endocrinology*. 2014;394(1-2):80-7.
37. Du RH, Wu FF, Lu M, Shu XD, Ding JH, Wu G, et al. Uncoupling protein 2 modulation of the NLRP3 inflammasome in astrocytes and its implications in depression. *Redox biology*. 2016;9:178-87.
38. Gupta AK, Ghosh K, Palit S, Barua J, Das PK, Ukil A. Leishmania donovani inhibits inflammasome-dependent macrophage activation by exploiting the negative regulatory proteins A20 and UCP2. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2017;31(11):5087-101.
39. Lu M, Sun XL, Qiao C, Liu Y, Ding JH, Hu G. Uncoupling protein 2 deficiency aggravates astrocytic endoplasmic reticulum stress and nod-like receptor protein 3 inflammasome activation. *Neurobiology of aging*. 2014;35(2):421-30.
40. Rajanbabu V, Galam L, Fukumoto J, Enciso J, Tadikonda P, Lane TN, et al. Genipin suppresses NLRP3 inflammasome activation through uncoupling protein-2. *Cellular immunology*. 2015;297(1):40-5.
41. Moon JS, Lee S, Park MA, Siempos, II, Haslip M, Lee PJ, et al. UCP2-induced fatty acid synthase promotes NLRP3 inflammasome activation during sepsis. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(2):665-80.
42. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):376-85.
43. Ryan B, Joilin G, Williams JM. Plasticity-related microRNA and their potential contribution to the maintenance of long-term potentiation. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2015;8:4.
44. Iacomino G, Siani A. Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. *Genes & nutrition*. 2017;12:23.
45. Hijmans JG, Diehl KJ, Bammert TD, Kavlich PJ, Lincenberg GM, Greiner JJ, et al. Influence of Overweight and Obesity on Circulating Inflammation-Related microRNA. *MicroRNA*. 2018;7(2):148-54.
46. Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet*. 2006;38(2):228-33.

47. Mitchelson KR, Qin WY. Roles of the canonical myomiRs miR-1, -133 and -206 in cell development and disease. *World J Biol Chem.* 2015;6(3):162-208.
48. Yu H, Lu Y, Li Z, Wang Q. microRNA-133: expression, function and therapeutic potential in muscle diseases and cancer. *Curr Drug Targets.* 2014;15(9):817-28.
49. Tacke F, Roderburg C, Benz F, Cardenas DV, Luedde M, Hippe HJ, et al. Levels of circulating miR-133a are elevated in sepsis and predict mortality in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2014;42(5):1096-104.
50. Kim S, Park JW, Lee MG, Nam KH, Park JH, Oh H, et al. Reversine promotes browning of white adipocytes by suppressing miR-133a. *Journal of cellular physiology.* 2018.
51. Frias FT, Rocha KCE, de Mendonca M, Murata GM, Araujo HN, de Sousa LGO, et al. Fenofibrate reverses changes induced by high-fat diet on metabolism in mice muscle and visceral adipocytes. *Journal of cellular physiology.* 2018;233(4):3515-28.
52. Chou CH, Shrestha S, Yang CD, Chang NW, Lin YL, Liao KW, et al. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic acids research.* 2018;46(D1):D296-D302.
53. Bandyopadhyay S, Lane T, Venugopal R, Parthasarathy PT, Cho Y, Galam L, et al. MicroRNA-133a-1 regulates inflammasome activation through uncoupling protein-2. *Biochemical and biophysical research communications.* 2013;439(3):407-12.
54. Fred RG, Bang-Berthelsen CH, Mandrup-Poulsen T, Grunnet LG, Welsh N. High glucose suppresses human islet insulin biosynthesis by inducing miR-133a leading to decreased polypyrimidine tract binding protein-expression. *PLoS one.* 2010;5(5):e10843.
55. Jin X, Chen D, Zheng RH, Zhang H, Chen YP, Xiang Z. miRNA-133a-UCP2 pathway regulates inflammatory bowel disease progress by influencing inflammation, oxidative stress and energy metabolism. *World journal of gastroenterology.* 2017;23(1):76-86.
56. Chen X, Wang K, Chen J, Guo J, Yin Y, Cai X, et al. In vitro evidence suggests that miR-133a-mediated regulation of uncoupling protein 2 (UCP2) is an indispensable step in myogenic differentiation. *The Journal of biological chemistry.* 2009;284(8):5362-9.
57. Yuan Y, Yao YF, Hu SN, Gao J, Zhang LL. MiR-133a Is Functionally Involved in Doxorubicin-Resistance in Breast Cancer Cells MCF-7 via Its Regulation of the Expression of Uncoupling Protein 2. *PLoS one.* 2015;10(6):e0129843.

CAPÍTULO 2

ARTIGO ORIGINAL: OBESITY IS ASSOCIATED WITH A DOWNREGULATION OF *UCP2* AND *MIR-133a-3p* BUT NOT *NLRP3* IN SUBCUTANEOUS ADIPOSE TISSUE