

EFEITO DA INIBIÇÃO DO microRNA-34c* NA HIPERTROFIA DE CARDIOMIÓCITO EM CULTURA CELULAR

Clara Nóbrega¹, Edilamar Menezes de Oliveira²

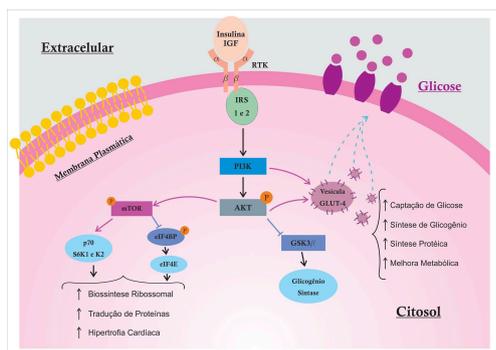
1. Mestranda da Escola de Educação Física da Universidade de São Paulo – EEFUSP; *claranobrega@usp.br
2. Pesquisadora do Depto. de Biodinâmica do Movimento do Corpo Humano, EEFUSP, São Paulo/SP

Palavras Chave: *Treinamento Físico, Hipertrofia Cardíaca, microRNA.*

Introdução

Hipertrofia cardíaca (HC) é um mecanismo adaptativo do miocárdio em resposta ao aumento de sobrecarga hemodinâmica, levando a alterações estruturais e funcionais com o intuito de diminuir o estresse imposto a parede deste tecido. Classicamente, a HC induzida pelo treinamento físico aeróbio (TFA), que possui caráter fisiológico, é ativada pela via de PI3K-AKT-mTOR ativando a p70S6K. Entretanto, animais nocautes para PI3K, quando submetidos ao TFA, apresentam HC remanescente, despertando o interesse pelo estudo de reguladores dessa via que podem estar induzindo diretamente a HC fisiológica, independentemente da via clássica da PI3K-AKT-mTOR.

Figura 1: Via da PI3K-AKT-mTOR, induzindo HC fisiológica, bem como melhora metabólica de cardiomiócitos.



Estudos realizados em animais submetidos à TFA de natação durante 10 semanas observaram uma diminuição de 98% na expressão do microRNA-34c* no ventrículo esquerdo quando comparado aos animais sedentários. Entendendo que microRNAs (miR) são reguladores negativos da expressão gênica, através de análise *in silico*, encontramos que o miR-34c* tem como genes alvo preditos o eIF4E e o KLF11, envolvidos na via hipertrofica e metabólica, respectivamente, sendo, portanto, um possível regulador da HC fisiológica. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi testar a hipótese que a inibição do miR-34c* é capaz de promover hipertrofia fisiológica em cardiomiócitos, acompanhada de melhora no metabolismo celular, independentemente da ativação da via hipertrofica da AKT-mTOR ou de estímulos bioquímicos ou mecânicos.

Resultados e Discussão

Para tanto, foi feita cultura primária de cardiomiócitos a partir de VE de ratos *Wistar* neonatos, que foram mantidos em meio DMEM-H com 10% Soro de cavalo e 5% Soro de bezerro neonato, em estufa úmida a 37°C e 5% CO₂. Quarenta e oito horas após o plaqueamento, as células foram transfectadas com inibidor (amiR-34c*) e superexpressor (mmiR-34c*) do miR-34c*, utilizando-se de oligofectamina. Após 72 horas da transfecção, o RNA total

foi extraído por Tryzol e a expressão do miR-34c*, dos seus genes alvo e genes correlatos, foi analisada em real time PCR. Assim, observou-se que a expressão do miR-34c* diminuiu linearmente com o aumento da concentração de amiR-34c*, sendo o pico dessa diminuição de 71% (50nM; p<0,01) quando comparado ao grupo controle (C), enquanto houve aumento de 41000% (50nM; p<0,01) no grupo tratado com o mmiR-34c* vs. C. O tratamento com amiR-34c* aumentou a expressão gênica do eIF4E em 64% (p<0,003) e do KLF11 em 192% (p<0,006), enquanto o tratamento com mmiR-34c* reduziu em 53% (p<0,003) e 39,6% (p<0,006), respectivamente. Não houveram diferenças significativas nas expressões de eIF4G, eIF4BP1, IRS1 e 2, além do IGF. Quando analisados os marcadores de HC patológica, verificou-se redução de 6,1% na α -actina esquelética no amiR-34c* vs. C (p<0,02), e aumento de 84,4% no ANF no mmiR-34c* vs. C (p<0,05). Já em relação a β -MHC, houve redução de 66,37% no amiR-34c* vs. C, e aumento de 42,2% no mmiR-34c* vs. C (p<0,03), dados que demonstram HC do tipo fisiológica quando os cardiomiócitos foram tratados com amiR-34c*, e patológica quando tratados com o mmiR-34c*. Afim de responder aos questionamentos acerca da possível mudança metabólica, foi feita dosagem de glicose do meio de cultura celular através do equipamento ACCU-Check Performa, havendo uma diminuição de 12,3% na glicose do meio de cultura dos cardiomiócitos tratados com amiR-34c* em relação ao C (p<0,04), demonstrando aumento na captação de glicose pelas células com o miR-34c* inibido. Para validação do KLF11 como gene alvo do miR-34c*, foi feita a quantificação da atividade da luciferase por ensaio de luminescência, quando houve redução de 55,3% (p<0,02) na luminescência do grupo transfectado com plasmídeo com o gene do KLF11+mmiR-34c* vs. grupo apenas com mmiR-34c*, evidenciando que o KLF11 é, de fato, alvo direto do miR-34c*.

Conclusões

Os resultados sugerem que o tratamento com amiR-34c* foi eficaz na inibição do miR-34c*, levando ao aumento da expressão gênica dos seus alvos, eIF4E e KLF11, na redução de marcadores de HC patológica, e no aumento da captação de glicose. Dados que, somados à manutenção da expressão gênica do eIF4BP1 e eIF4G, genes diretamente envolvidos na regulação da atividade do eIF4E, do IRS1 e 2, e IGF, envolvidos com o KLF11, sinalizam que o miR-34c* pode regular diretamente a via de HC induzida pelo TFA, figurando como potente fator cardioprotetor.

Agradecimentos

Ao programa PIBIC/CNPq pela concessão de bolsas de Iniciação Científica nos períodos 2013/2014, 2014/2015 e 2015/2016.