UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**O MicroRNA *miR-696* regula a expressão da proteína
PGC-1 α e induz à disfunção mitocondrial em células
musculares de camundongos através do sistema
SNARK/*miR-696*/PGC-1 α**

André Lima Queiroz

**RIBEIRÃO PRETO
2016**

André Lima Queiroz

O MicroRNA *miR-696* regula a expressão da proteína PGC-1 α e induz à disfunção mitocondrial em células musculares de camundongos através do sistema SNARK/*miR-696*/PGC-1 α

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Dos Reis Silveira

**RIBEIRÃO PRETO
2016**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Queiroz, André Lima

O MicroRNA *miR-696* regula a expressão da proteína PGC-1 α e induz à disfunção mitocondrial em células musculares de camundongos através do sistema SNARK/*miR-696*/PGC-1 α

143f.:il.; 30cm.

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Silveira, Leonardo R.

1. *miR-696*. 2. Função Mitocondrial. 3. Músculo Esquelético. 4. SNARK. 5. PGC-1 α .

FOLHA DE APROVAÇÃO

André Lima Queiroz

O MicroRNA *miR-696* regula a expressão da proteína PGC-1 α e induz à disfunção mitocondrial em células musculares de camundongos através do sistema SNARK/*miR-696*/PGC-1 α

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Dos Reis Silveira

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

Dedico este trabalho àqueles que desde do momento da concepção
agiram em nome do AMOR. À minha MÃE, Regina Lúcia Lima Queiroz, e ao
meu PAI, João Queiroz Júnior, pelas horas dedicadas à minha formação como
homem.

Àquele Eu, que outrora fui e as vezes volto a ser. À sua persistência,
peciência e coragem. Ao egocentrismo, esvaído de narcisismo, vivido nas noites
solitárias em busca de conhecimento e reconhecimento.

**“Toda despedida é dor. Tão amarga todavia, que eu preferiria
nunca ter-te conhecido!”**

Adaptado de William Shakespeare.

Agradecimentos Especiais

Agradeço a Deus por seu amor incondicional, por nunca ter me abandonado e representar toda a forma e busca de conhecimento.

Agradeço à família Lima Queiroz por todo o apoio, mesmo à distância, e por poder desfrutar dessa amizade tão preciosa. Aos meus pais, meu irmão Filipe e minha irmã Débora.

Agradeço a minha amada Amanda! Por todo o Amor que vivemos juntos...por ser a mulher mais doce que conheci na vida...pelos sonhos inspiradores que realizamos ou ainda vamos realizar...pela companhia mais prazerosa que já experimentei...por ser a realização de um sonho! Te amo!

Ao meu querido amigo e pai científico, Malson, por ter me confiado sua amizade e feito de mim um conhecedor da bioquímica.

Aos meu estimado amigo Renato pelos inúmeros momentos de alegria e bebedeira.

Ao casal Rafael e Mariana pelo bate papo filosófico, pelas jogatinas, pelos filmes e seriados, por todos os momentos que compartilhamos e pela amizade.

Aos amigos de Laboratório: Igor Sampaio, Lucas, Bruno Gonzaga, Michel, Tanes, Simone, Madla, Reginaldo, Hygor, Eveline, Carlos e Luh.

Aos amigos Bruno Rodrigues, Leka, Elise, Leo, Taylon.

Àqueles que de alguma forma contribuíram para execução desse trabalho.

Agradecimentos

Ao Professor Leonardo dos Reis Silveira por ter acreditado no meu potencial e me orientado, mesmo no caminhos mais obscuros, e ter me dado a oportunidade de abrir os olhos para o valor da ciência. Seu exemplo é de grande valia para a minha jornada como um futuro educador.

A Professora Ísis do Carmo Kettelhut por ser tão meiga em suas palavras independentemente da situação, por seu exemplo de pesquisador e por ter me aceitado em seu laboratório para execução da grande maioria dos meus experimentos. Também aos técnicos e alunos do laboratório: Antonieta, Pila, Lillian, Víctor, Dawit, William, Rafa, Danilo, Juliano, Samyra, Sílvia, Leandro, Fran e Grazi.

Ao Professores Fernando de Lucca pelo incentivo no projeto com microRNAs. E a Professora Thais Amaral e Sousa pelo pontapé inicial em todos os meus experimentos e pela paciência para ensinar.

A Professora Enilza Maria Espreafico pelas ensinamentos e pelo espaço cedido para realização dos experimentos de clonagem. Também as técnicas e alunos do laboratório Silmara, Joana, Lucas, Marcela, Jackeline, Fernanda, Johnny, Rui, Talita e Cibeles.

Agradeço a Professora Luciane Carla Alberici pelo espaço cedido para a realização dos experimentos de consumo de oxigênio, bem como pelos conselhos científicos.

Agradeço aos professores do programa de bioquímica da FMRP, pois foram fundamentais para minha formação como bioquímico e pesquisa de doutorado.

Agradeço a Professora Laurie Goodyear pela oportunidade ímpar de trabalhar ao lado dela em um dos grupos de maior prestígio na área do diabetes. Aos amigos que fiz em Boston: Kawai, Tiago, Vicência, Minakshi, Joram, Becca, Taka, Jia, May, Mike, Sarah, Noah, Pasquale, Kristin e Alison. Também a todos os colegas que fiz no Joslin Diabetes Institute.

A Ivone pela paciência, eficiência e carinho.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP).

Agradeço aos membros da banca pela disposição do tempo e orientação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida durante este período e pela bolsa de doutorado sanduíche.

RESUMO

QUEIROZ, A. L. O MicroRNA *miR-696* regula a expressão da proteína PGC-1 α e induz à disfunção mitocondrial em células musculares de camundongos através do sistema SNARK/*miR-696*/PGC-1 α , 2016. XXXf. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

A disfunção mitocondrial pode ser um mecanismo chave associado à ocorrência de doenças metabólicas como o diabetes. Neste contexto, é importante observar os mecanismos envolvidos nesse processo. MicroRNAs (miRs) são conhecidos por regular a expressão de genes em vários processos fisiológicos, incluindo o metabolismo de glicose e ácidos graxos, biogênese mitocondrial, proliferação, diferenciação e morte celular no músculo esquelético. Usando análise "*in silico*" (Sfold2.2) identificamos 219 microRNAs que, potencialmente, se ligam à região 3'UTR do *PGC-1 α* , um gene envolvido na biogênese mitocondrial e no metabolismo de glicose. Dos 219 candidatos, encontramos um alto valor de energia livre de hibridização entre o microRNA *miR-696* e *PGC-1 α* (-29,8 kcal / mol), sugerindo que o *miR-696* poderia estar envolvido na regulação negativa do *PGC-1 α* resultando em disfunção mitocondrial. Consistente com esta hipótese, observamos que a expressão do *miR-696* apresentou-se aumentada nos músculos esqueléticos de dois modelos de camundongos com diabetes: camundongos diabéticos induzidos por STZ e camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Para compreender se o *miR-696* regula a disfunção mitocondrial utilizamos células musculares C2C12 expostas a uma alta dose de ácido palmítico (700 μ M) durante 24 horas, o que causou uma redução na expressão de genes mitocondriais, bem como no consumo de oxigênio. Vale destacar que a inibição do *miR-696* através da transfecção de oligonucleotídeos antisenso (ASO) preveniu, parcialmente, a perda da função mitocondrial de células C2C12 tratadas com ácido palmítico. Curiosamente, não houve nenhuma alteração nos níveis de *miR-696* em modelos envolvidos com a proteína AMPK, tal como em células C2C12 incubadas com uma droga ativadora de AMPK (AICAR) e no músculo esquelético de camundongos transgênicos superexpressando *AMPK α 2* com o domínio quinase inativo ou *AMPK γ 3* com mutação de ativação crônica (R70Q). Em contraste, a expressão alterada de uma quinase relacionadas com a AMPK, SNF1-AMPK-related kinase (SNARK), recentemente demonstrada por ter sua expressão aumentada em virtude do envelhecimento, exerceu efeitos significativos sobre a expressão do *miR-696*, como por exemplo sua redução dependente do *knockdown* de SNARK em células C2C12. Consistente com estes resultados, a superexpressão de SNARK em células C2C12 resultou no aumento da expressão do *miR-696* e redução na expressão do PGC-1 α , bem como no consumo de oxigênio. Nossos resultados demonstram que o estresse metabólico aumenta a expressão do *miR-696* no músculo esquelético, que por sua vez inibe a sinalização da PGC-1 α e a função mitocondrial. Ainda, apesar da AMPK não se apresentar como mediadora da expressão do *miR-696*, SNARK pode desempenhar um papel neste processo através do mecanismo de sinalização SNARK-*miR-696*-PGC-1 α .

Palavras Chave: *miR-696*, Função Mitocondrial, Músculo Esquelético, SNARK, PGC-1 α .

ABSTRACT

QUEIROZ, A. L. MicroRNA *miR-696* regulates PGC-1 α expression and induces mitochondrial dysfunction in mouse skeletal muscle cells through SNARK/*miR-696*/PGC-1 α pathway. XXXf. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2017.

Mitochondrial dysfunction may be a key underlying mechanism for occurrence of metabolic disease and diabetes; thus elucidating how this process occurs is of great value. MicroRNAs (miRs) are known to regulate gene expression in several physiological processes including metabolism, mitochondrial biogenesis, proliferation, differentiation and cell death in multiple tissues including adipose tissue and skeletal muscle. Using “*in silico*” analysis (Sfold2.2) we identified 219 unique microRNAs that potentially bind to the 3'UTR region of PGC-1 α , a gene involved in mitochondrial biogenesis and glucose metabolism. Out of the 219 candidates, there was a high value of hybridization free energy between the microRNA *miR-696* and PGC-1 α (-29.8 kcal/mol), suggesting that *miR-696* could be involved in the downregulation of PGC-1 α , which in turn could cause mitochondrial dysfunction. Consistent with this hypothesis we found that *miR-696* expression was increased in the skeletal muscles of two mouse models of diabetes that have impaired mitochondrial function: STZ-induced diabetic mice and chronic high fat fed mice. To understand if *miR-696* regulates mitochondrial dysfunction we used C2C12 muscle cells exposed to a high dose of palmitic acid (700 μ M) for 24 hours, which caused a decrease in mitochondrial gene expression and in oxygen consumption. Importantly, inhibition of *miR-696* using an antisense oligo approach rescued the mitochondrial function by restoration of mitochondrial-related genes and increased oxygen consumption in the palmitic acid-treated C2C12 cells. Interestingly, there was no change in *miR-696* levels in models involved with AMP-activated protein kinase such as C2C12 cells incubated with AICAR, skeletal muscle from AMPK α 2 dominant-negative transgenic mice, and transgenic mice overexpressing the activating R70Q AMPK mutation. In contrast, altered expression of the AMPK-related kinase, SNF1-AMPK-related kinase (SNARK), recently shown to increase with aging, had significant effects on *miR-696* expression. Knockdown of SNARK in C2C12 cells significantly decreased *miR-696*. Consistent with these findings, SNARK overexpression in C2C12 cells increased *miR-696* concomitant with a decrease in PGC-1 α expression and decreased oxygen consumption. Our findings demonstrate that metabolic stress increases *miR-696* expression in skeletal muscle which in turn inhibits PGC-1 α signaling and mitochondrial function. While AMPK does not mediate *miR-696* expression, SNARK may play a role in this process through a SNARK-*miR-696*-PGC-1 α signaling mechanism.

Keywords: *miR-696*, mitochondrial dysfunction, skeletal muscle, SNARK and PGC-1 α

LISTA DE ABREVIATURAS

3'UTR	Região final do mRNA (não traduzida)
5'UTR	Região inicial do mRNA (não traduzida)
α	Alpha
μM	Micromolar
Ala (A)	Alanina
ADP	Adenosina 5' -difosfato
AICAR	5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide
AMP	Adenosina 5' -monofosfato
ASO	Oligonucleotídeo Antisenso
ATP	Adenosina 5' -trifosfato
Asp (D)	Aspartato
β	Beta
BSA	Albumina de soro bovino
C2C12	Células musculares esqueléticas de camundongos
cDNA	DNA complementar
CO₂	Dióxido de carbono
°C	Graus Celsius
DAG	Diacilglicerol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Dithiothreitol
EDL	<i>Extensor digitorum longus</i>
ETC	Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial
EPM	Erro padrão da média
γ	Gamma

FBS	Soro fetal bovino
g	Grama
Gln (Q)	Glutamina
GFP	Proteína verde fluorescente
Gln (Q)	Glutamina
GSH	Glutathiona reduzida
HEK293	Células embrionárias de rim
HEPES	N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
hΔG	Energia livre de hibridização
HFD	Dieta hiperlipídica
HS	Soro de cavalo
kDa	Kilo Daltons
kg	Kilograma
L	Litro
Lys (K)	Lisina
μg	Micrograma
μL	Microlitro
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
min	Minuto
miRs	MicroRNAs
miRNA	MicroRNA
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
mRNA/miRNA	Interação mRNA e miRNA

mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
mmu	<i>Mus musculus</i>
mV	Milivolts
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
nt	Nucleotídeo
PBS	Tampão salina fosfato
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picolomes
PTM	Modificação pós-traducional
q-PCR	PCR em tempo real
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
Arg (R)	Arginina
RFP	Proteína vermelha fluorescente
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT	Transcriptase reversa
RTQ	Receptor tirosina quinase
STZ	Estreptozotocina
seg	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
Ser (S)	Serina
SFB	Soro Fetal Bovino
SRM	Sinal retrógrado mitocondrial
siRNA	<i>Small Interference</i> RNA
TA	<i>Tibialis anterior</i>
TAE	Tampão ris-acetato-EDTA
TCA	ciclo do ácido cítrico
TBS-T	Tampão salina Tris com Tween 20
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina
TG	Triacilglicerol
Thr (T)	Treonina
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
VO₂	Volume máximo de oxigênio
x g	Rotações gravitacionais

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mensurações sanguíneas em camundongos tratados com estreptozotocina.....	64
Tabela 2. Mensurações sanguíneas em camundongos tratados com dieta hiperlipídica.	67
Tabela 3 - Lista de microRNAs com afinidade pela 3'UTR do mRNA de PGC-1α	111
Tabela 4. Lista de primers para qRT-PCR	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sobrecarga metabólica no músculo esquelético -----	25
Figura 2. Regulação global de PGC-1 α -----	28
Figura 3. Regulação da função de PGC-1 α -----	30
Figura 4. Biogênese de microRNA -----	32
Figura 5. Sinal Retrógrado e as modificações pós-traducionais (PTMs) --	36
Figura 6. Análise bioinformática dos microRNAs com afinidade à 3'UTR do mRNA de PGC-1 α -----	54
Figura 7. Esquema da interação entre a região 3'UTR do <i>PGC-1α</i> e o <i>miR-696</i> -----	55
Figura 8. Superexpressão da PGC-1 α e do <i>miR-696</i> em cultura primária de células musculares de ratos -----	57
Figura 9. Ensaio repórter para confirmação da interação entre PGC-1 α e <i>miR-696</i> -----	59
Figura 10. Expressão relativa dos genes <i>miR-696</i> e PGC-1 α em tecidos musculares esqueléticos com com características metabólicas opostas	61
Figura 11. Expressão relativa dos genes <i>miR-696</i> e PGC-1 α nos tecidos baço, rim, tecidos adiposos branco e marrom em camundongos -----	63
Figura 12. Expressão relativa dos genes <i>miR-696</i> e PGC-1 α em camundongos submetidos ao tratamento com estreptozotocina -----	65
Figura 13. Expressão relativa dos genes <i>miR-696</i> e PGC-1 α em camundongos submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica -----	68
Figura 14. Expressão relativa do gene <i>miR-696</i> em células C2C12 durante a diferenciação -----	69
Figura 15. Expressão relativa dos genes <i>miR-696</i> e PGC-1 α em células C2C12 submetidos ao tratamento com palmitato -----	70
Figura 16. Expressão relativa dos genes relacionados à mitocôndria após transfecção com o mimético ou o inibidor do <i>miR-696</i> -----	71
Figura 17. Emissão de peróxido de hidrogênio após transfecção com o mimético ou o inibidor do <i>miR-696</i> -----	72

Figura 18. Consumo de oxigênio após transfecção com o mimético ou o inibidor do <i>miR-696</i> -----	74
Figura 19. Fosforilação da proteína Akt após transfecção com o mimético ou o inibidor do <i>miR-696</i> -----	76
Figura 20. Concentração de ATP após tratamentos com AICAR de diferentes concentrações de palmitato-----	78
Figura 21. Efeito dos tratamentos com palmitato ou AICAR na função mitocondrial-----	80
Figura 22. Expressão relativa dos genes <i>miR-696</i> e <i>PGC-1α</i> em camundongos transgênicos para AMPK-----	82
Figura 23. Expressão relativa de SNARK em camundongos submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica-----	83
Figura 24. Expressão relativa dos genes relacionados com a função mitocondrial em camundongos submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica -----	84
Figura 25. Efeito do silenciamento de SNARK sobre os níveis de mRNA e de proteína-----	86
Figura 26. Efeito do silenciamento de SNARK sobre a transcrição de genes relacionados com a função e biogênese mitocondrial -----	87
Figura 27. Efeito do silenciamento de SNARK no consumo de oxigênio -	88
Figura 28. Efeito da superexpressão de SNARK nos próprios níveis de RNA e proteína -----	89
Figura 29. Efeito da superexpressão de SNARK no consumo de oxigênio -----	90
Figura 30. Expressão relativa dos genes <i>miR-696</i> e <i>PGC-1α</i> em camundongos transgênicos para SNARK-----	92
Figura 31. Mecanismo proposto para a indução da disfunção mitocondrial pelo <i>miR-696</i> -----	99
Figura 32. Genotipagem de camundongos AMPK γ 3 -----	121
Figura 33. Genotipagem de camundongos AMPK α 2 DN -----	122
Figura 344. Genotipagem de camundongos SNARK DN e SNARK SWT	123
Figura 35. Mapas dos plasmídeos usados para clonagem -----	124

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Diabetes - Síndrome Metabólica	21
1.2. PGC-1 α : Gene, Proteína e Regulação	26
1.3. microRNAs.....	30
1.4. Sinal Retrógrado Mitocondrial	35
2. Objetivo	40
2.1. Objetivo geral	40
2.2. Objetivos Específicos	40
3. Materiais e Métodos.....	42
3.1. Análise bioinformática da interação entre miRs e a 3'UTR de PGC-1 α	42
3.2. Indução do diabetes em camundongos através de estreptozotocina	42
3.3. Indução do diabetes em camundongos através de dieta hiperlipídica.....	43
3.4. Geração de camundongos transgênicos para AMPK ou SNARK .	43
3.5. Plasmídeos e construções	44
3.6. Isolamento e cultura de miócitos primários de ratos	46
3.7. Cultura de células C2C12	46
3.8. Cultura de células HEK293.....	47
3.9. Transfecção de siRNA, miR e anti-miR em células C2C12.....	47
3.10. Transfecção de plasmídeos	47
3.11. Ensaio repórter	48
3.12. Western Blotting	48
3.13. PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	49
3.14. qRT-PCR para MicroRNA	49
3.15. Consumo de Oxigênio em Miotubos	50

3.16.	Consumo de Oxigênio em Mioblastos	50
3.17.	Determinação da produção de ROS (H ₂ O ₂).....	51
3.18.	Intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)	51
3.19.	Conteúdo de ATP	52
3.20.	Aprovação do Estudo	52
3.21.	Análise Estatística	52
4.	Resultados	53
4.1.	Análise bioinformática dos microRNAs com afinidade à região 3'UTR do mRNA de PGC-1 α	53
4.2.	PGC-1 α é alvo de miR-696	55
4.2.1.	Superexpressão da PGC-1 α e do <i>miR-696</i> em cultura primária de células musculares de ratos.....	55
4.2.2.	Efeito da superexpressão e inibição do <i>miR-696</i> na expressão da PGC-1 α	56
4.2.3.	Ensaio repórter para confirmação da interação entre PGC-1 α e <i>miR-696</i>	58
4.3.	O perfil de expressão do <i>miR-696</i> possui correlação negativa direta com a expressão da PGC-1 α no músculo esquelético	60
4.3.1.	Expressão relativa do <i>miR-696</i> e do PGC-1 α em tecidos musculares esqueléticos com com características metabólicas opostas	60
4.3.2.	Expressão relativa do <i>miR-696</i> e do PGC-1 α nos tecidos baço, rim, tecidos adiposos branco e marrom em camundongos	62
4.3.3.	Expressão relativa dos genes <i>miR-696</i> e PGC-1 α em camundongos submetidos ao tratamento com estreptozotocina.....	64
4.3.4.	Expressão relativa dos genes <i>miR-696</i> e PGC-1 α em camundongos submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica	66
4.3.5.	Expressão relativa do gene <i>miR-696</i> em células C2C12 durante a diferenciação.....	69
4.4.	A inibição do <i>miR-696</i> sob os efeitos deletérios provocados pela exposição à altas concentrações de palmitato	70

4.4.1. Expressão relativa dos genes <i>miR-696</i> e PGC-1 α em células C2C12 expostas à altas concentrações de palmitato.....	70
4.4.2. Expressão relativa dos genes relacionados à mitocôndria após transfecção com o mimético ou o inibidor do <i>miR-696</i>	71
4.4.3. Emissão de peróxido de hidrogênio após transfecção com o mimético ou o inibidor do <i>miR-696</i>	72
4.4.4. Consumo de oxigênio após transfecção com o mimético ou o inibidor do <i>miR-696</i>	73
4.4.5. Fosforilação da proteína Akt após transfecção com o mimético ou o inibidor do <i>miR-696</i>	75
4.5. AMPK não regula a expressão do <i>miR-696</i> em células do músculo esquelético	77
4.5.1. Concentração de ATP em células C2C12 expostas ao palmitato e AICAR.....	77
4.5.2. Efeito do tratamento com palmitato ou AICAR na função mitocondrial de células C2C12	79
4.5.3. Expressão de PGC-1 α e <i>miR-696</i> em músculo esquelético de camundongos com AMPK cronicamente ativa ou inativa	81
4.6. SNARK está envolvida na regulação da transcrição do <i>miR-696</i> .	83
4.6.1. Expressão de SNARK e genes relacionados com a função mitocondrial no músculo esquelético de camundongos tratados com dieta hiperlipídica	83
4.6.2. Efeito do silenciamento da proteína SNARK na função mitocondrial de células C2C12	85
4.6.3. Efeito da superexpressão de SNARK na função mitocondrial	89
4.6.4. Expressão de PGC-1 α e <i>miR-696</i> em músculo esquelético de camundongos com superexpressão ou inativação de SNARK	91
5. Discussão	93
6. Conclusão	98
7. Referências	100
8. Apêndice.....	111
8.1. Apêndice A	111

8.2. Apêndice B – Genotipagem dos camundongos transgênicos para AMPK e SNARK.....	121
8.3. Apêndice C – Mapa dos plasmídeos usados para clonagem.....	124
8.4. Apêndice D	125
8.5. Apêndice E – ARTIGOS PUBLICADOS.....	127

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diabetes - Síndrome Metabólica

Nas últimas décadas, a síndrome metabólica tem surgido como desordens sistêmicas associadas a algumas condições patológicas incluindo diabetes, obesidade, hipertensão, intolerância à glicose, resistência à insulina e dislipidemia. Todas estas patologias exercem impacto direto na qualidade de vida da população e na economia mundial. Um estudo bastante robusto envolvendo mais de 4,4 milhões de participantes adultos revelou que o gasto anual com o diabetes no mundo se aproxima aos 825 bilhões de dólares. Através de uma análise comparativa, observou-se um aumento de 4,3% em 1980 para 9% em 2014, entre indivíduos diabéticos homens; enquanto que, entre mulheres diabéticas esses valores foram de 5% para 7,9%. Estes dados correspondem a um aumento de 332 milhões de indivíduos adultos com diabetes entre 1980 a 2014. Especificamente no Brasil, o número de indivíduos diabéticos saltou de 2,7 milhões em 1980 para 11,7 milhões em 2014 e o país se encontra na 4ª posição no *ranking* de países com maior quantidade de indivíduos diabéticos (NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) 2016).

A diabetes é definida pela incapacidade dos tecidos de captarem ou armazenarem glicose, sendo dividida entre diabetes tipo 1 e tipo 2. A diabetes tipo 1 é caracterizada pela falência das células β -pancreáticas resultando na impossibilidade de produzir insulina; enquanto, na diabetes tipo 2, tecidos periféricos têm dificuldade de responder à insulina determinando, desta forma, o que chamamos de resistência à insulina (Kong et al. 2013).

Níveis elevados de inflamação e o mau funcionamento do metabolismo de ácidos graxos e glicose têm sido associados ao desenvolvimento da resistência à insulina em vários tecidos, incluindo o músculo esquelético (Pal et al. 2013), fígado (Kodama et al. 2015) e tecido adiposo (Wueest et al. 2010). Nos últimos anos, o número de estudos voltados ao diabetes ou ao mecanismo associado ao desenvolvimento da resistência à insulina tem aumentado bastante (Kim et al. 2008; Muoio e Newgard 2008; Samuel et al. 2010). Entretanto, ainda há muita controvérsia a respeito dos mecanismos responsáveis pela instalação desta patologia. Sabe-se hoje que existe um forte consenso na literatura sobre a estreita relação entre resistência à insulina,

inatividade física e elevada disponibilidade de nutrientes (Petersen et al. 2003; Ropelle et al. 2006; Silveira et al. 2008; Savage et al. 2007; Samuel et al. 2010). Alguns modelos experimentais têm sido usados para comprovar a ocorrência desta relação, como por exemplo: animais submetidos à dieta hiperlipídica (DHL) (Hoehn et al. 2010; Carvalho-Filho et al. 2009; Hirabara et al. 2007; Choi et al. 2007) e linhagens celulares expostas à alta disponibilidade de nutrientes (Sabin et al. 2007).

Em particular, o músculo esquelético, no estado pós-prandial, é o maior responsável pela captação de glicose do corpo. Além disso, em condições normais de glicose sanguínea atrelada a um estado hiperinsulinêmico, este tecido é capaz de utilizar, aproximadamente, 80% da glicose disponível (DeFronzo e Tripathy 2009). O transporte de glicose pelas células musculares ocorre, majoritariamente, via proteínas transportadoras de glicose como a *glucose transporter 1* (GLUT1) e a *glucose transporter 4* (GLUT4). Todavia, os mecanismos de transporte da glicose por essas proteínas são diferentes: no estado basal de captação de glicose, o qual ocorre sem a presença de insulina, a proteína GLUT1 é responsável por este transporte. Por outro lado, no estado estimulado por insulina, GLUT4 é responsável por esse processo após ser translocada para a membrana celular (He et al. 2003) em um mecanismo iniciado através da interação entre insulina e seu receptor gerando uma cascata de fosforilação em proteínas como *insulin receptor substrate-1* (IRS-1), *phosphatidylinositide 3-kinase* (PI3K), *protein kinase B* (PKB/AKT), *Akt substrate of 160 kDa* (AS160) e Rab (Jewell et al. 2010). Logo após a captação da glicose pelos seus transportadores, esta molécula será metabolizada em duas fases, um processo denominado glicólise. A primeira fase ocorre em cinco passos, nos quais, o primeiro e o terceiro passos, utilizam duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) para preparar a molécula de glicose para a segunda fase. Ainda nesta fase, o produto final são duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato. A segunda fase também acontece em cinco passos, nos quais, a partir das duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato preparadas na primeira fase da glicólise, são produzidas duas moléculas de piruvato, quatro moléculas de ATP e duas moléculas de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (NADH) (Ashwell 1964; Caputto et al. 1967).

Além de consumir glicose para produção de energia imediata no

processo de glicólise, o tecido muscular possui a capacidade de armazenamento desta mesma molécula na forma de glicogênio para posterior utilização caso necessite realizar atividades físicas com alto grau de intensidade. O mecanismo para síntese de glicogênio, assim como na sinalização em função da insulina, ocorre via cascata de fosforilação de proteínas como *protein kinase B* (PKB) e *glycogen synthase kinase* (GSK3), tendo esta última a função de fosforilar a proteína glycogen synthase (GS) que é responsável por incorporar a molécula de glicose em uma molécula de glicogênio preexistente por meio de uma reação de catálise envolvendo a molécula de UDP-glicose (Klip 2009; Jentjens e Jeukendrup 2003).

Foi observado que 30% da glicose consumida por indivíduos normais, no estado pós-prandial, destina-se à síntese de glicogênio muscular (Taylor et al. 1993). No corpo humano, o músculo esquelético armazena aproximadamente 80% do glicogênio que é, preferencialmente, utilizado como substrato para exercícios físicos geralmente realizados em intensidades acima de 70% do volume máximo de oxigênio consumido (VO_2) (Klip 2009).

Todavia, apesar de possuir uma alta capacidade de consumo da glicose sanguínea, seja no intuito de produzir energia imediata ou para posterior utilização em momentos de carência da glicose exógena, o tecido muscular pode apresentar uma situação de incapacidade na captação dessa molécula, como é o caso da resistência à insulina.

Muitas hipóteses têm sido levantadas com intenção de caracterizar o mecanismo responsável pela instalação deste quadro em células musculares esqueléticas. Entretanto, até agora, o mecanismo consensual para o desenvolvimento da resistência à insulina no diabetes tipo 2 está ligado à sobrecarga metabólica, onde o excesso de nutrientes, principalmente ácidos graxos, somado à inatividade física geram oxidação de ácidos graxos incompleta aumentando a quantidade de triglicerídeo (TG), diacilglicerol (DAG) e ceramidas. Nesta situação, também ocorre o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são responsáveis por ativar proteínas quinases, cuja atividade impede a translocação de GLUT4 (Ding et al. 2016; Aoi et al. 2013). Em outras palavras, produtos da oxidação incompleta de ácidos graxos aumentam a emissão de ROS pela mitocôndria contribuindo para a instalação da resistência à insulina. Devemos ressaltar que o aumento na ingestão de

nutrientes, com consequente elevação na entrada de ácidos graxos livres nas células, induz a ativação na expressão de genes mediados pelos receptores nucleares *peroxisome proliferator-activated receptor alfa* ou *gamma* (PPAR α/γ) promovendo β -oxidação, porém sem aumento coordenado com os componentes do ciclo do ácido cítrico (CAT). Entretanto, durante a realização de exercício físico, tanto a proteína *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α* (PGC-1 α), descrita por auxiliar no processo de biogênese mitocondrial, como os receptores nucleares PPAR α/γ promovem um aumento coordenado entre o fluxo do CAT e o processo de β -oxidação (Muoio e Newgard 2008). Além disso, o exercício físico fortalece o sistema de defesa antioxidante das células musculares, evitando que a sinalização por meio de proteínas quinases prejudique a translocação de GLUT4 (Ristow et al. 2009) (Figura 1).

Figura 1. Sobrecarga metabólica no músculo esquelético

O excesso no consumo de nutrientes pode estar associado com a instalação da resistência à insulina em células do tecido muscular esquelético. O aumento descoordenado entre o processo de β -oxidação e a função mitocondrial aumenta o estresse gerado pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (ETC) na forma de ROS, o qual contribui para a ativação de proteínas Ser-Quinase e impedem a translocação de GLUT4. Ser-quinases, proteínas quinases (Serina); CPT1, *carnitine palmitoyltransferase-1*; DAG, diacilglicerol; ETC, cadeia transportadora de elétrons; GLUT4, *glucose transporter-4*; LC-CoAs, acil CoAs de cadeia longa; PPAR γ , *peroxisome proliferator-activated receptor- γ* ; PGC-1 α , *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α* ; ROS, espécies reativas de oxigênio; RXR, *retinoid X receptor*; TCA, ciclo do ácido cítrico; TF, fator de transcrição; TGs, triglicerídeos. (Muoio e Newgard 2008).

É importante destacar que outros modelos de disfunção mitocondrial incluindo atrofia muscular, imobilização e envelhecimento têm sido associados com a instalação da resistência à insulina na musculatura esquelética (Abbatecola et al. 2011; Tardif et al. 2014). Dentre os mecanismos envolvidos neste processo, a supressão da via de sinalização PI3K/Akt, a ativação de proteínas apoptóticas como a caspase-3 e a via proteolítica ubiquitina-proteassoma são os principais causadores da degradação proteica (Wang et al. 2006). Ratos submetidos a protocolo de imobilização apresentam atrofia muscular acompanhada de resistência à insulina. Este efeito foi associado à redução na expressão da proteína *insulin receptor substrate - 1* (IRS-1) com consequente redução na atividade da proteína Akt (Hilder et al. 2005). Camundongos tratados com estreptozotocina, um composto tóxico para células β -pancreáticas, também apresentaram grau severo de atrofia muscular e foram

induzidos ao diabetes (Hudson et al., 2014; Pagel-Langenickel et al., 2010). Além disso, um estudo observou que *nuclear respiratory* fator (NRF2) e PGC-1 α , proteínas envolvidas na biogênese mitocondrial, apresentaram expressão reduzida após tratamento com estreptozotocina (Whitman et al., 2013).

De fato, estudos apontam evidências de que a disfunção mitocondrial e a expressão alterada de genes metabólicos estão correlacionadas com várias doenças metabólicas, tais como diabetes e obesidade (Perry et al. 2015; Mootha et al. 2003). Indivíduos fisicamente ativos apresentam adaptações que os protegem de desordens metabólicas associadas ao estilo de vida moderno (sedentarismo, estresse e alimentação inadequada). Tais adaptações vêm sendo descritas pelo aumento no gasto energético corporal e refletidos no aumento da biogênese e função mitocondrial dos tecidos periféricos como é o caso do tecido muscular esquelético (Greene et al. 2015; Coen et al. 2015). É importante ressaltar que indivíduos diabéticos têm apresentando redução na função mitocondrial, bem como na expressão de genes envolvidos com a biogênese ou com a cadeia respiratória desta organela (Patti et al. 2003; Mootha et al. 2003). Além disso, casos específicos de mutação no DNA mitocondrial (mtDNA) ou redução no número de mitocôndrias se mostraram determinantes para o desenvolvimento do diabetes ou de outras doenças metabólicas (Mitochondrial Medicine Society's Committee on Diagnosis et al. 2008; Kadowaki et al. 1994; Burkart et al. 2016; Rötig e Poulton 2009).

A biogênese mitocondrial é um processo complexo que requer a transcrição de genes provenientes do genoma mitocondrial, no qual 13 deles dão origem a proteínas presentes na ETC. Aproximadamente, 1500 proteínas derivadas do genoma nuclear (nDNA) participam da biogênese mitocondrial (El-Hattab e Scaglia 2016). Nos últimos 20 anos, muitas proteínas têm apresentado papel fundamental neste processo. No entanto, algumas delas recebem atenção especial como é o caso das NRFs, *transcription factor A mitochondrial* (TFAM) e PGC-1 α .

1.2. PGC-1 α : Gene, Proteína e Regulação

Dentre as proteínas envolvidas na biogênese mitocondrial, PGC-1 α tem sido uma das mais estudadas nos últimos anos devido a forte correlação entre

a redução na sua expressão e a presença do diabetes (Sczelecki et al. 2014; Patti et al. 2003; Laker et al. 2014; Wu et al. 2016; Lu et al. 2008; Mootha et al. 2003). Além disso, PGC-1 α exerce importante controle molecular na regulação do metabolismo oxidativo, modulação dos tipo de fibras musculares, oxidação dos ácidos graxos, gliconeogênese e angiogênese (Martínez-Redondo et al. 2015; Patti et al. 2003; Arany 2008; Safdar et al. 2011; Scarpulla 2006; Ruas et al. 2012). O gene de PGC-1 α está localizado no cromossomo 4p15.1 do genoma humano e codifica uma proteína de 798 aminoácidos com peso molecular aproximado de 91 kDa. Foi, primeiramente, identificada como uma proteína ligante do receptor nuclear PPAR em células do tecido adiposo marrom, sendo, desta forma, inicialmente caracterizada como um coativador de PPAR γ promovendo a diferenciação de fibroblastos em adipócitos marrons (Puigserver et al. 1998). Estudos recentes descreveram que o processo de transcrição do PGC-1 α é regulado pelo mecanismo de “*splicing*” alternativo resultando em quatro isoformas: PGC-1 α -1, α -2, α -3 e α -4. Todavia, até o presente momento, somente as isoformas PGC-1 α -1 (PGC-1 α) e PGC-1 α -4 foram descritas na literatura (Martínez-Redondo et al. 2015; Ruas et al. 2012).

Um estudo realizado em cultura de células musculares de camundongos verificou que PGC-1 α está envolvida na transcrição de GLUT4, na ativação da proteína Akt, presente na via de sinalização da insulina e, portanto, na captação de glicose (Michael et al. 2001). Tanto o exercício, como a exposição ao frio demonstraram aumentar a expressão de PGC-1 α (Oliveira et al. 2004; Mathai et al. 2008) e, concomitantemente, a sensibilidade à insulina (Reichkender et al. 2013; Hanssen et al. 2015). A superexpressão de PGC-1 α , especificamente no tecido muscular de camundongos, foi responsável pelo aumento no consumo de oxigênio (Wong et al. 2015; Tadaishi et al. 2011), no número de fibras do tipo I (Summermatter et al. 2012), na quantidade de mitocôndrias (Greene et al. 2015), nos produtos do ciclo do ácido cítrico (Hatazawa et al. 2015), na expressão de genes da cadeia transportadora de elétrons (Pérez-Schindler et al. 2012) e na expressão da proteína mioglobina (Liang et al. 2009). Desta forma, fortalecendo o conceito de que o aumento da capacidade oxidativa induz o aumento na captação de glicose. Interessantemente, camundongos nocautes para PGC-1 α no músculo esquelético apresentaram redução na função mitocondrial e metabolismo

glicolítico anormal (Handschin et al. 2007).

Entre as proteínas que regulam PGC-1 α , estão *thyroid hormone* (TH), *nitric oxide synthase* (NOS/cGMP), *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38/MAPK), *sirtuines* (SIRTs), *calcineurin* (CaN), *calcium-calmodulin-activated kinases* (CaMKs), *adenosine-monophosphate-activated kinase* (AMPK), *cyclin-dependent kinases* (CDKs). Enquanto que, entre os fatores de transcrição responsivos à PGC-1 α estão as NRFs, *estrogen-related receptors* (ERRs) e os receptores nucleares com atividade transcricional, PPARs. Além disso, PGC-1 α também pode ser ativada por estimulação β -adrenérgica (Chinsomboon et al. 2009) (Figura 2).

Figura 2. Regulação global de PGC-1 α

Thyroid hormone (TH), *nitric oxide synthase* (NOS/cGMP), *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38MAPK), *sirtuines* (SIRTs), *calcineurin* (CaN), *calcium-calmodulin-activated kinases* (CaMKs), *adenosine-monophosphate-activated kinase* (AMPK), *cyclin-dependent kinases* (CDKs), e estimulação β -adrenérgica têm sido descritos como reguladores da expressão e/ou ativação de PGC-1 α . A ativação de alguns receptores nucleares como as NRFs, *estrogen-related receptors* (ERRs) e PPARs ocorre através da co-ativação realizada por PGC-1 α . Esses receptores nucleares são reconhecidos por regular a expressão de genes envolvidos no metabolismo energético incluindo a biogênese mitocondrial, captação de glicose, aumento na oxidação de ácidos graxos e a defesa antioxidante. (Chinsomboon et al. 2009).

A sinalização para regular a atividade do PGC-1 α envolve fatores ambientais ou de estresse incluindo frio, exercício físico e dieta (Chinsomboon et al. 2009; Andres et al. 2015). Além destes, sua regulação ocorre majoritariamente através de modificações pós-traducionais como, por exemplo, fosforilação, acetilação, metilação, ubiquitinação, entre outras. Sob essas condições, o controle na atividade de proteínas quinases como AMPK, Akt3, CaMK, P38 MAPK e *protein kinase A* (PKA) é fundamental para induzir, ou não, a atividade do PGC-1 α por meio de reações de fosforilação. Por exemplo, durante o frio ou a realização de exercício físico, o aumento na concentração do segundo mensageiro adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) ativa as proteínas quinase PKA e CaMK, as quais podem fosforilar a proteína *cAMP response element* (CRE)-*binding protein* (CREB). Ao ser fosforilada, CREB liga-se ao promotor de PGC-1 α promovendo sua transcrição (Herzig et al. 2001). O exercício, de maneira isolada, ativa a proteína P38 MAPK, que por sua vez fosforila PGC-1 α diretamente nos resíduos treonina-262, serina-265 e treonina-268. Quando fosforilados, estes resíduos impedem a interação entre PGC-1 α e seu inibidor p160MBP (Puigserver et al. 2001; Sano et al. 2007). Ainda mais, Akt3 foi identificada como outra proteína quinase que regula atividade de PGC-1 α via *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Wright et al. 2008). Em condições de privação de nutrientes, uma das proteínas quinases com maior destaque foi AMPK, a qual possui a capacidade de fosforilar os resíduos treonina-177 e serina-538 de PGC-1 α (Jäger et al. 2007). Além de sofrer modificações realizadas por meio de fosforilações, PGC-1 α pode ser alvo de deacetilação e acetilação por intermédio das proteínas SIRT1 e GCN5, respectivamente. Em condições de privação de nutrientes, onde ocorre aumento na razão NAD⁺/NADH, a proteína SIRT1 é ativada promovendo a deacetilação de PGC-1 α e, conseqüentemente, sua ativação (Hayashida et al. 2010; Lerin et al. 2006) (Figura 3). Portanto, a proteína PGC-1 α exerce um papel central na regulação molecular do programa genético mitocondrial em células musculares controlado por receptores nucleares incluindo os PPARs.

Figura 3. Regulação da função de PGC-1 α

O controle da transcrição de PGC-1 α está intimamente relacionado com sinais ambientais, a disponibilidade de nutrientes e demanda energética celular. A transcrição, propriamente dita, é governada após ativação de vias de sinalização por meio de ácidos graxos livres, AMPK, calcineurin, p38 MAPK, CaMK IV, SIRT1 e PKA, e a supressão através de proteínas como GCN5, AKT e *small heterodimer partner* (SHP). Além disso, a atividade de PGC-1 α pode ser regulada por processos de acetilação e fosforilação de alguns dos fatores ilustrados. Finalmente, PGC-1 α aumenta a biogênese mitocondrial e a capacidade de realizar a fosforilação oxidativa. (Andres et al. 2015).

1.3. microRNAs

Apesar de inúmeros trabalhos voltados a desvendar a rede regulatória envolvendo PGC-1 α , pouco se sabe a respeito da regulação deste gene por meio de microRNAs (miRs). MiRs são pequenas sequências de RNA não codificantes (entre 18-25 nucleotídeos), capazes de interromper o processo pós-transcricional impedindo a expressão de proteínas alvo dos mesmos (Biggar e Storey 2015; Issler e Chen 2015). Estas moléculas são capazes de se ligarem, parcialmente ou completamente, à região 3'UTR do RNA mensageiro (mRNA) inibindo o processo de tradução ou resultando em

degradação. O processo de transcrição dos miRs pode ser descrito, a grosso modo, pelo processamento de transcritos primários em precursores de miRs que, por sua vez, serão processados gerando o microRNA (miRNA). Todavia, cada etapa da biogênese dos miRs merece ser destacada. Inicialmente, após o estímulo necessário, ocorre a transcrição de uma região intrônica específica, a qual irá gerar um transcrito longo (Pri-miRNA) contendo, ao longo de sua sequência, várias outras sequências em formato de grampo. Ainda dentro do núcleo celular, a sequência Pri-miRNA será processada por uma enzima chamada Drosha, a qual reconhece a estrutura circular na extremidade das sequências em formato de grampo e promove a clivagem dos flancos 5' e 3' gerando o Pre-miRNA. Em seguida, o Pre-miRNA é exportado do núcleo para o citoplasma por uma proteína chamada Exportin-5 que reconhece uma saliência de 2 nucleotídeos (nt) na extremidade 3' para realizar esse transporte. No citoplasma, a estrutura circular na extremidade do Pre-miRNA é clivada pela proteína Dicer gerando uma fita dupla de miRNA, que, logo após, é dissociada permitindo que o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) se ligue à fita madura de miRNA e seja ativado. O miRNA funciona como um guia para encontrar o mRNA alvo e, em seguida, permite que o RISC impeça o processo de tradução da proteína (Biggar e Storey 2015; Issler e Chen 2015) (Figura 4).

Figura 4. Biogênese de microRNA

miRs são inicialmente transcritos como pri-miRNA (*step 1*) e processados em pre-miRNA dentro do núcleo (*step 2*). O pre-miRNA é exportado para o citoplasma (*step 3*), onde, em seguida, é processado em miRNA maduro (*step 4*) e incorporado no complexo de silenciamento de RNA (RISC) (*step 5*). O miRNA maduro então guia o RISC em direção ao mRNA alvo para impedir a tradução ou provocar degradação (*steps 6 e 7*). Figura de (Biggar e Storey 2015).

O reconhecimento da região 3'UTR do mRNA alvo pelo miRNA, o qual serve como sequência guia para que ocorra a hibridização entre os dois, acontece de maneira bastante peculiar. Na sequência do miRNA está contida uma região com alta especificidade de interação com o mRNA, denominada região *seed*, e compreendida pela sequência entre o segundo e o oitavo nucleotídeos a partir da extremidade 5' do miRNA (Broughton et al. 2016).

Inúmeras metodologias têm sido utilizadas com objetivo de determinar a interação *in silico* entre mRNA alvo e miRNA. Dentre as mais comuns, está o uso de ferramentas que permitem a predição de hibridização entre estas moléculas como, por exemplo, *STarMir*, *miRanda*, *TargetScan*, *RNAhybrid*, *PicTar*, entre outros. Cada uma dessas ferramentas possui uma metodologia

específica para geração das informações relacionadas com a complementaridade entre mRNA/miRNA. A *STarMirDB*, por exemplo, (<http://sfold.wadsworth.org/>) é uma ferramenta online que permite a geração de dados para avaliar quais miRs estariam interagindo com a região 3'UTR de um determinado mRNA. Através deste programa online é possível obter diversas variáveis da relação miRNA/mRNA, como a conservação do sítio de interação com o miRNA presente na 3'UTR do mRNA alvo (Site_C), a conservação da região *seed* no miRNA (Seed_C), a conservação dos nucleotídeos presentes na 3'UTR do mRNA alvo que não se ligam com a região *seed* do miRNA (Offseed_C), a energia livre de hibridização entre mRNA/miRNA (ΔG), entre outros. Entretanto, essas ferramentas não levam em consideração dados pré-existent na literatura a respeito dos miRs e seus possíveis alvos.

Muitos miRs foram descritos com potencial de alterar a expressão gênica de inúmeros processos biológicos incluindo a diferenciação celular, a biogênese mitocondrial e a via de sinalização da insulina (Lima et al. 2016), bem como o metabolismo de lipídeos (Massart et al. 2016). Alguns miRs têm sido envolvidos com diversas doenças como diabetes (Feng et al. 2016), câncer (Lu et al. 2005), insuficiência renal aguda (Lee et al. 2014), entre outros. Assim, observou-se recentemente que os miRs miR-23a e miR-761 reduzem a expressão de PGC-1 α , sendo atribuídos como a principal causa para a disfunção mitocondrial no tecido muscular cardíaco e esquelético de camundongos, respectivamente (Sun et al. 2014; Xu et al. 2015). Além destes, outro microRNA proposto para desempenhar um papel na função mitocondrial, também por intermédio de PGC-1 α é o *miR-696* (Aoi et al. 2010). Este microRNA está presente em um *loci* intergênico no cromossomo 3 e na sua forma madura ou fita simples, a sequência deste miRNA segue na direção 3'-5'. Foi relatado pela primeira vez como sendo expresso no desenvolvimento pré-natal (E9.5) de embriões de camundongo (Mineno et al. 2006). O exercício físico de resistência aeróbia, o qual melhora a sensibilidade à insulina, foi capaz de reduzir a expressão do *miR-696*, enquanto o protocolo de imobilização, o qual provoca atrofia e resistência à insulina, aumentou a expressão de *miR-696* em camundongos (Aoi et al. 2010). Estes estudos descritos sugerem que PGC-1 α pode ser fortemente regulada por miRs.

Estudos recentes mostraram que a expressão de miRs é alterada em

resposta ao estresse e à demanda energética celular (Biggar e Storey 2015; Huang et al. 2016; Xie e Chen 2016; Hollins e Cairns 2016). Observou-se que o estresse induzido pelo calor foi responsável por aumentar a expressão dos miRs: miR160a, miR166a, miR167h, e miR5175a em grão de cevada. Além de, aumentar a expressão de outros 30 miRs e reduzir 28 miRs no músculo esquelético de porcos, em sua maioria relacionados ao metabolismo glicolítico (Kruszka et al. 2014; Hao et al. 2016). A ausência do miR-22 sensibilizou o tecido cardíaco de camundongos à hipertrofia do miocárdio em função do estresse induzido pelo tratamento com isoproterenol, um droga agonista de receptores adrenérgicos β_1 e β_2 (Huang et al. 2013). Ainda no tecido cardíaco, camundongos transgênicos superexpressando o miR-499 também apresentaram hipertrofia do miocárdio e disfunção cardíaca dependente do estresse induzido por modelo de sobrecarga da pressão cardíaca (Shieh et al. 2011). Um estudo realizado em plastídeos, organelas responsáveis pela fotossíntese em plantas e algas, mostrou que a biossíntese de flavonóides nesta organela estaria sendo regulada pela ação de miRs (Gläßer et al. 2014). Outro trabalho realizado em plantas observou que a expressão de alguns miRs apresentou padrões semelhantes ao tratamento com oligomicina, um inibidor químico da atividade da ATP-sintase, sugerindo que a biogênese de miRs, em plantas, poderia ser regulada pela inibição da função mitocondrial (Yang et al. 2013). Ainda, foi relatado que a superexpressão do miR-423-3p em células musculares de camundongos (C2C12) reduziu os níveis de ATP e a expressão de um gene cuja proteína pertence à cadeia transportadora de elétrons (Cox6a2) (Siengdee et al. 2015). Além disso, a redução na expressão de Brg1, uma proteína dependente de ATP cuja função está relacionada com diferenciação do músculo esquelético, resultou na diminuição da expressão de diversos miRs indicando forte dependência na expressão de miRs com o status energético celular (Mallappa et al. 2010). Tendo por base os trabalhos acima mencionados, é nítido a função exercida pelos miRs em um contexto metabólico, onde flutuações nos níveis de ATP ou de vias envolvidas no metabolismo celular são capazes de alterar a dinâmica do miRs. Assim, podemos hipotetizar que o estresse metabólico imposto pela elevada disponibilidade de nutrientes pode alterar a expressão de PGC-1 α em uma via de sinalização envolvendo miRs.

1.4. Sinal Retrógado Mitocondrial

Alterações na dinâmica energética celular através da mudança nos níveis de metabólitos intracelulares resultante de variações na disponibilidade de nutrientes são capazes de ativar a transcrição de genes envolvidos na função mitocondrial. A via de sinalização de comunicação entre mitocôndria e núcleo é definida como sinal retrógado mitocondrial (SRM). O SRM é caracterizado pela resposta a um estímulo, capaz de alterar a bioenergética mitocondrial gerando um sinal inicial dentro da mitocôndria (sinal retrógado primário) que pode ser transmitido diretamente para o núcleo, ou gerar um sinal retrógado secundário, geralmente por intermédio de modificações pós-traducionais (PTM) em uma cascata de sinalização até alcançar o núcleo. No núcleo, esses sinais produzem as mais diversas respostas, dentre elas, a alteração na expressão de genes mitocondriais (sinalização anterógrada) completando o ciclo iniciado pelo SRM (Schwarzländer et al. 2012; Wallace 2012; Kleine e Leister 2013) (Figura 5).

Sendo assim, nos atentamos para a lacuna existente entre a transcrição de miRs e a função mitocondrial regulada por PGC-1 α . Poucos estudos têm abordado a alteração na expressão de miRs em função do SRM, tão pouco descrevendo o envolvimento de PGC-1 α nessa mesma situação. Um estudo apontou que a superexpressão de PGC-1 α , em fibroblastos, preveniu estas células de tornarem-se suscetíveis ao estresse induzido pela exposição à radiação infravermelha. Desta forma, admitindo que o SRM contribui para esse processo de susceptibilidade das células da pele ao dano celular induzido por radiação (Schroeder et al. 2007). Outro estudo revelou que o tratamento com ácido retinóico foi capaz de recuperar a expressão de genes da fosforilação oxidativa através da indução na atividade do complexo PGC-1 α /RXRA em células com disfunção mitocondrial e SRM alterado (*retinoid X receptor alpha*) (Chae et al. 2013).

Figura 5. Sinal Retrógrado e as modificações pós-traducionais (PTMs)

A ação de um sinal externo ou estresse causa perturbações no metabolismo mitocondrial desencadeando respostas mediadas por PTMs. Uma dessas respostas gera adaptação ao sinal através de regulação por *feedback* com contribuição das PTMs. Em outro caso, intermediários metabólicos são produzidos como um sinal retrógrado primário que pode ir diretamente ao núcleo ou iniciar um sinal retrógrado secundário e ativar uma sinalização em cascata até chegar ao núcleo. Ambos os casos protagonizam a modulação da expressão de genes envolvidos com a mitocôndria. (Hartl e Finkemeier 2012).

É de extrema relevância definir como o SRM chega ao núcleo celular. Neste sentido, as proteínas quinases surgem como mediadoras chaves do sinal retrógrado secundário através da sinalização envolvendo fosforilações serina/treonina (Hartl e Finkemeier 2012). Foi relatado que a expressão de genes dependentes do SRM pode ser induzida em condição de estresse osmótico num mecanismo dependente da atividade da proteína *stress-activated protein kinase* (SAPK) (Ruiz-Roig et al. 2012). Outro estudo demonstrou que a disfunção mitocondrial, em células C2C12, reduziu a expressão de *Irs1*, em um mecanismo de SRM mediado pelas quinases JNK e p38MAPK. Além de, prejudicar a sinalização da via de insulina, bem como a captação de glicose (Lim et al. 2006). Poucos estudos têm sido realizados com o intuito de descrever se as proteínas quinases estão envolvidas no SRM, como mediadoras da transcrição de miRs induzido pelo estresse e, ao mesmo tempo, responsivas às alterações na função mitocondrial como, por exemplo, nos níveis de ATP ou no consumo de oxigênio. Sendo assim, duas delas aparecem como fortes candidatas a possuírem papel relevante no SRM induzido por uma condição metabólica severa como o diabetes.

A primeira delas, AMPK, é uma proteína heterotrimérica de 62 kDa estruturada com uma subunidade catalítica α e duas subunidades regulatórias β e γ (Moffat e Harper 2010). Observou-se que a subunidade α é responsável por fosforilar outras proteínas através do resíduo de treonina-172, enquanto que a subunidade β foi relatada por inibir a síntese de glicogênio e a subunidade γ por ligar-se às moléculas de ATP, ADP ou AMP (Hardie 2014). AMPK também foi descrita por apresentar atividade aumentada no músculo esquelético de camundongos exercitados, além de induzir a fosforilação de PGC-1 α , porém não foi observado aumento nos marcadores mitocondriais em função de sua ativação ou inativação (Röckl et al. 2007; Jäger et al. 2007). Ainda, apesar de não apresentar efeitos diretos sobre o aumento da função mitocondrial, mesmo tendo controle sobre a ativação de PGC-1 α , AMPK tem sido amplamente aceita como uma proteína chave no mecanismo de resistência à insulina (Ruderman et al. 2013).

Em cultura de células HEK293, foi relatado que AMPK age como proteína mediadora do SRM em situações de baixos níveis de ATP. A interação entre as proteínas Sirt4 e ANT2 aumentam os níveis de ATP impossibilitando

AMPK de agir sobre PGC-1 α e *acyl-CoA Carboxylase* (ACC). Porém, quando a interação entre Sirt4 e ANT2 foi interrompida, os níveis de ATP reduziram e, consequentemente, sinalizando para AMPK agir sobre PGC-1 α e ACC, ativando e inativando, respectivamente. Como resultado, foi possível observar aumento na expressão dos genes relativos à biogênese mitocondrial e oxidação de ácidos graxos, além da promoção da β -oxidação e na quantidade de mitocôndrias (Ho et al. 2013). Outro estudo, no qual células B16F10 (modelo de melanoma em camundongos) foram submetidas à superexpressão da proteína *uncoupling protein 2* (UCP2), cuja função está relacionada ao processo de desacoplamento mitocondrial, relatou que a alteração da função mitocondrial induzida por UCP2, inicia um SRM mediado pelo eixo AMPK/HIF alterando o fenótipo das células cancerígenas (Esteves et al. 2014).

Algumas proteínas têm sido classificadas como “quinase relacionada com AMPK” (AMPK-RK), as quais foram identificadas por possuírem uma sequência homóloga no domínio catalítico α (domínio quinase) de AMPK. Entre estas, uma proteína de 70 kDa, mais conhecida como *sucrose non fermenting AMPK-related kinase* (SNARK ou NUA2), foi descrita por possuir 42% de homologia com o domínio catalítico de AMPK (Koh et al. 2010). Muitos trabalhos vincularam a expressão/atividade da SNARK com o aumento do estresse celular. Um estudo realizado em 2005, em células cancerígenas, demonstrou que a atividade de SNARK é regulada em estados de elevado estresse metabólico incluindo o estresse do retículo endoplasmático; aumento nos níveis de AMP e/ou depleção de ATP; dano no DNA; e estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (Lefebvre e Rosen 2005). Ainda, foi observado aumento na expressão de SNARK em cultura de células musculares expostas a diferentes concentrações de ácido palmítico ou ao fator *tumoral necrosis factor alfa* (TNF α) (Rune et al. 2009). O mesmo sendo observado em músculo esquelético de camundongos alimentados cronicamente com dieta hiperlipídica (Lessard et al. 2016) ou de indivíduos obesos (Rune et al. 2009). Curiosamente, SNARK foi descrita como um fator de transcrição, haja vista sua translocação do citoplasma para núcleo dependente do fragmento de localização nuclear (68-KKAR-71) na porção N-terminal de sua estrutura e sua co-localização com o núcleo celular. Além disso, SNARK foi capaz de alterar o transcriptoma celular após remoção do 68-KKAR-71 (Kuga et al. 2008).

Sendo assim, as proteínas AMPK e SNARK possuem um papel relevante no metabolismo celular, pois participam como proteínas sinalizadoras no citoplasma e caracterizam-se como excelentes alvos de estudo nos mecanismos envolvendo o SRM. Portanto, com base na regulação da expressão de SNARK e AMPK pelo estresse metabólico, levantamos a hipótese de que as proteínas SNARK e AMPK possam exercer controle sobre a regulação da expressão do *miR-696* e, dessa forma, alterar a expressão de PGC-1 α e, conseqüentemente, a função mitocondrial.

A disfunção mitocondrial pode ser um mecanismo chave associado para ocorrência de doenças metabólicas como o diabetes e tem sido vinculada ao processo de instalação de resistência à insulina no tecido muscular esquelético. Sendo assim, elucidar os mecanismos envolvidos nesta patologia requer atenção especial. Logicamente, prevenir, ou até reverter, a disfunção mitocondrial sugere o entendimento nas vias de sinalização da biogênese mitocondrial. Uma das proteínas mais estudada nesse campo, nos últimos anos, foi PGC-1 α tendo sido intimamente relacionada com o diabetes. Sendo assim, ressaltamos a relevância de entender os processos de regulação desta proteína na condição do diabetes. Os miRs são conhecidos por regular a expressão de genes em vários processos fisiológicos, incluindo o metabolismo de glicose e ácidos graxos, biogênese mitocondrial, proliferação, diferenciação e morte celular no tecido muscular esquelético. Assim, descobrir que miRs estariam envolvidos no controle da expressão de PGC-1 α , bem como qual mecanismo associado à transcrição destes miRs, no músculo esquelético, poderá despertar novos conhecimentos voltados a solucionar os problemas decorrentes do diabetes. Nesta tese, levantamos as seguintes hipóteses: 1) O microRNA *miR-696* está aumentado em situações de elevado estresse metabólico; 2) PGC-1 α é regulada pelo *miR-696* no diabetes; 3) AMPK e SNARK medeiam o sinal retrógrado mitocondrial influenciando a expressão do *miR-696*.

Objetivo

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

Avaliar se a expressão do co-ativador de PPAR, PGC-1 α , é regulada pelo *miR-696* em células musculares e músculo esquelético de animais controles, diabéticos e nocautes para as proteínas AMPK e SNARK, examinando a possível associação entre esse miRNA, a respiração mitocondrial, a resposta à insulina e o sinal retrógrado mitocondrial.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Determinar os microRNAs que, possivelmente, interagem com o mRNA de PGC-1 α através de análise *in silico*;
- b) Examinar a expressão da proteína PGC-1 α em células musculares de ratos após transfecção com a sequência mimética do *miR-696*;
- c) Examinar a interação entre a região 3'UTR do PGC1 α e o *miR-696* através de ensaio repórter com GFP em células HEK293;
- d) Determinar a expressão do *miR-696* em tecidos com diferentes capacidades mitocondriais: adipócito branco, adipócito marrom, músculo *soleus*, músculo EDL (*extensor digitorum longus*), músculo TA (*tibialis anterior*), rim e baço;
- b) Examinar a correlação entre a expressão gênica do PGC-1 α e *miR-696* em tecidos musculares com capacidades mitocondriais distintas: *soleus*, EDL e TA;
- e) Avaliar a expressão gênica do PGC-1 α e *miR-696* em tecido muscular (TA) de camundongos submetidos ao tratamento com STZ (estreptozotocina);
- f) Avaliar a expressão gênica do PGC-1 α e *miR-696* em tecido muscular (TA) de camundongos submetidos ao tratamento com HFD (dieta hiperlipídica);
- g) Examinar o perfil na expressão do *miR-696*, durante a diferenciação, em cultura de células musculares C2C12;
- h) Examinar o efeito da transfecção do microRNA *miR-696* (mimético), bem como do inibidor do microRNA *miR-696* (ASO), na função mitocondrial, nos genes relacionados com biogênese mitocondrial, na fosforilação de Akt e na emissão de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em células musculares C2C12;

- i) Determinar a concentração de ATP em células musculares C2C12 expostas ao ácido palmítico e ao ativador de AMPK, AICAR;
- j) Avaliar a expressão gênica do PGC-1 α e *miR-696*, o consumo de oxigênio e os intermediários do ciclo do ácido cítrico em cultura de células musculares C2C12 expostas ao ácido palmítico e ao ativador de AMPK, AICAR;
- k) Examinar a expressão gênica do PGC-1 α e do *miR-696* no tecido muscular (TA) de camundongos transgênicos para AMPK;
- l) Examinar o efeito da inibição da expressão de SNARK, bem como, da sua superexpressão, na transcrição dos genes do PGC-1 α e do *miR-696*, na função mitocondrial e nos genes relacionados com biogênese mitocondrial em células musculares C2C12;
- m) Examinar a expressão gênica do PGC-1 α e do *miR-696* em tecido muscular (TA) de camundongos transgênicos de SNARK.

Materiais e

Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Análise bioinformática da interação entre miRs e a 3'UTR de PGC-1 α

A análise bioinformática dos miRs que interagem com a região 3'UTR de PGC-1 α foi realizada com auxílio da ferramenta online <http://sfold.wadsworth.org>. Essa ferramenta é capaz de gerar dados referentes aos miRs expressos em camundongos que venham a interagir com a região 3'UTR de qualquer gene através de um algoritmo desenvolvido para avaliar essa interação a partir da estrutura secundária dos RNAs (Ding and Lawrence 2003; Ding et al. 2004; Ding and Lawrence 2001). Especificamente em nosso estudo, utilizamos a plataforma STarMirDB inserida no site acima citado. Dentro desta plataforma selecionamos a espécie camundongos (Mouse-HITS-CLIP; NCBI RefSeq Construir 37,2) e inserimos o número de acesso do PGC-1 α no *Genebank* (NM_008904.2). A lista com os resultados obtidos pode ser encontrada no Apêndice A.

3.2. Indução do diabetes em camundongos através de estreptozotocina

Camundongos machos C57BL/6J (10-16 semanas de idade) foram colocados em gaiolas e mantidos em ciclo 12:12 horas claro/escuro com acesso a água e ração padrão *ad libitum*. Para indução do diabetes tipo 1, os camundongos foram injetados com estreptozotocina (STZ, 70 mg • kg⁻¹) através da veia jugular sob anestesia de isoflurano. STZ foi dissolvido em tampão de citrato 0,01 M (pH 4,5). Os camundongos controle receberam apenas tampão citrato (veículo) nas mesmas condições. Três dias após a injeção de STZ ou veículo, os camundongos foram sacrificados por decapitação para dissecação do tecido muscular *tibialis anterior* (TA) e amostragem de sangue, em que os níveis de glicose sanguínea e insulina sérica foram determinados. Os músculos foram colhidos, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C para posterior medição dos níveis de expressão de mRNAs e miRs.

3.3. Indução do diabetes em camundongos através de dieta hiperlipídica

Camundongos machos C57BL/6J de 6 semanas de idade foram colocados em gaiolas e mantidos em ciclo de 12:12 horas claro/escuro com água e ração *ad libitum*. Para indução ao diabetes tipo 2, os camundongos foram alimentados por 10 semanas com uma dieta hiperlipídica composta de 20% de energia de proteína, 20% de energia de carboidratos e 60% de energia de gordura (Research Diets, NJ, EUA, D12492). Enquanto isso, os camundongos controle foram alimentados com uma dieta que era composta de 20% de energia a partir de proteína, 70% de energia a partir de carboidratos e 10% de energia de gordura (Research Diets, NJ, EUA, D12450B). Os camundongos foram sacrificados com 16 semanas de idade, imediatamente o sangue foi coletado para análise dos níveis de glicose sanguínea, níveis séricos de insulina, triglicerídeos e de ácidos graxos livres. Os músculos TA, *extensor digitorum longus* (EDL) e *soleus* foram dissecados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C para posterior medição dos níveis de expressão de mRNAs e miRs.

3.4. Geração de camundongos transgênicos para AMPK ou SNARK

Camundongos transgênicos expressando AMPK com mutação dominante negativo na subunidade $\alpha 2$ (AMPK $\alpha 2$ DN), na qual foi realizado a troca de aminoácido aspartato na posição 157 por uma alanina (D157A) (Fujii et al. 2005) e camundongos transgênicos que expressam AMPK com uma mutação ativadora na sua subunidade $\gamma 3$ (AMPK $\gamma 3$ R70Q), na qual foi substituído um aminoácido arginina na posição 70 por uma glutamina (Barré et al. 2007) foram gerados a partir de camundongos FVB selvagem como descrito anteriormente.

Os camundongos transgênicos expressando a sequência referente ao gene SNARK em humanos foram gerados a partir da linhagem C57BL/6 como descrito anteriormente (Lessard et al. 2016). Nos camundongos com mutação dominante negativo (SNARK DN) foi realizado a troca do aminoácido treonina

na posição 208 por um aminoácido alanina (T208A). Também foram utilizados camundongos expressando a sequência selvagem de SNARK (SNARK WT).

Utilizaram-se como controle os camundongos que não apresentaram genotipagem positiva quanto à transgenia referente ao seu respectivo grupo (Apêndice B). Os camundongos foram sacrificados com idade entre 10-18 semanas e os músculos TA foram extraídos para análise dos níveis de mRNAs e miRs.

Para realização da genotipagem de ambas as linhagens, extraímos DNA da ponta da cauda dos animais 20 dias após o nascimento através do kit de extração de DNA genômico, *gDNA purification* (Fermentas™ GeneJET™ DNA Purification Kit, FISHER cat# FERK0722) de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante. Uma vez obtido o DNA genômico, realizamos a reação de PCR para genotipagem utilizando a enzima Taq DNA polimerase (ACCUPRIME TAQ DNA POL 200 RX, Life Technologies, cat# 12339016). Nessa reação, além do DNA genômico (40-50 ng) e a Taq DNA polimerase, usamos o tampão de PCR 10x que acompanha a enzima e os primers a seguir: AMPK α 2 DN, Senso - 5'-TAT CCA TAC GAT GTA CCA GAC TAC GC -3'; Antisenso - 5'- GAG AGT CCG AAG GCA GCT ATC TT -3'; AMPK γ 3 R70Q, Senso - 5' GCC CTG GTT GGG AGG GGA CAG 3'; Antisenso - 5' GGA GAA ATG CAG ACA AGC GG 3'; SNARK DN e SNARK WT, Senso - 5' ACAAGGACGACGATGCAAG 3'; Antisenso - 5' CAGGATGCTGTCCTCACTCA 3'. O produto da PCR obtido foi submetido à eletroforese em gel com 1,5% de agarose diluída em tampão TAE e a sonda GreenGlo™ (1:100 mL, DENVILLE SCIENTIFIC INC.). Após separação, as bandas visualizadas através do uso da luz ultravioleta foram observadas com os seguintes tamanhos: AMPK α 2 DN 500 bp; AMPK γ 3 - 650 bp; SNARK DN - 424 e ~300 bp; SNARK WT - 424 e ~300 bp.

3.5. Plasmídeos e construções

Os plasmídeos repórteres GFP e RFP, bem como o plasmídeo de PGC-1 α foram adquiridos através da empresa Addgene (cat. # 35625; # 35626; # 4). A sequência entre 245-400 pares de base (pb) da região 3'UTR do mRNA de PGC-1 α de camundongo foi sintetizada a partir de cDNA do tecido adiposo marrom através de reação de PCR utilizando a enzima *Taq DNA polimerase*

AccuPrime. Duas reações de PCR foram realizadas utilizando os *primers* senso: 3'UTR-3'- AGACTCGAGGATAATCCAGTAAGCACAC -5' e 3'UTRmt-3'- AGACTCGAGGATAATCCAGTAAG**G**TCACGTTT -5'; e para ambas as reações utilizamos o *primer* antisenso: 3'TACATCTAGAGAGAGAGAGAGCTTGCTG5'. Logo em seguida, os produtos dessas reações foram aplicados em gel de agarose 1% e purificado através do kit de extração de gel QIAquick® (QUIAGEN). Os produtos de PCR obtidos e os plasmídeo de PGC-1α e GFP foram submetidos à reação de clivagem, para posterior clonagem através das enzimas *XbaI* e *XhoI*. Após clivagem foi realizado nova extração dos produtos desejados usando o kit de extração de gel QIAquick®. A realização da clonagem foi feita com auxílio da enzima T4 Ligase (New England Biolabs) formando os plasmídeos: 1) contendo a sequência do gene de PGC-1α e a sequência 3'UTR de PGC-1α (PGC-1α -3'UTR); 2) contendo a sequência do gene de GFP e a sequência 3'UTR de PGC-1α (GFP-3'UTR-PGC1α); 3) contendo a sequência do gene de GFP e a sequência 3'UTR de PGC-1α mutada (GFP-3'UTRmt-PGC1α) de acordo com as instruções do fabricante. Para a superexpressão do *miR-696* foram adquiridos oligonucleotídeos complementares (Eurofins) com extremidades coesivas as com extremidades clivadas pela enzima *BspQ1* (New England Biolabs): Senso – 3'- gcgCTGTCCACAGCGAGCACACGCTAGTGAAGCCACAGATGTAG**CGGTGTG CTTGCTGTGGG**CCTT -5'; Antisenso – 3'- GACAGGTGTGCTCGTGTGCGATCACTTCGGTGTCTACAT**CGCACACGAA CGACACCC**GAAacg -5' (em negrito as sequências que dão origem a fita dupla do *miR-696*). Através de reação de anelamento, realizamos o pareamento das sequências citadas acima, utilizando 10 µL de cada oligo (10 µM), 2,5 µL de tampão 3 (Buffer 3, New England Biolabs) e 2,5 µL de água livre de RNase. Esta reação aconteceu, inicialmente, a 95 °C utilizando termociclador durante 5 min e, seguida por 10 min a 4 °C. O produto da reação foi diluído em 1:1000 e clonado no plasmídeo RFP (RFP-miR696) através da enzima *BspQ1*. Os mapas dos plasmídeos usados e a confirmação da clonagem dos insertos podem ser encontrados no Apêndice C.

Os plasmídeos para SNARK foram gerados como anteriormente descrito (Lessard et al. 2016). As construções foram sequenciadas pelo DNA sequence

Core Facility of the Brigham and Women's Hospital (Boston, EUA) para verificar as identidades dos insertos.

3.6. Isolamento e cultura de miócitos primários de ratos

Ratos Wistar machos pesando 50-60 g (4 semanas) foram anestesiados por anestesia com pentobarbital sódico (40 mg.kg^{-1}) e depois sacrificados por inalação de CO_2 . Os músculos dos membros posteriores, quadríceps, isquiotibiais, tibial anterior, extensor digital longo, *soleus* e gastrocnêmio foram rapidamente isolados utilizando solução salina tamponada com fosfato (PBS) (Sigma-Aldrich) contendo glicose (1%) e penicilina (1%). Os tecidos musculares foram picados e digeridos em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo collagenase II (1,5%), tripsina (2,5%), DNase (0,1%) e penicilina (1%) a 37°C durante 30 min. Logo após, 15mL de meio de cultura DMEM contendo 10% soro de cavalo e 10% soro fetal bovino (DMEMC) foi adicionado com objetivo de neutralizar a atividade da tripsina. O meio foi centrifugado ($4000 \times g$) a 4°C durante 20 min e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 20 mL meio DMEMC com adição de L-glutamina (2 mM) e penicilina (1%) (PGM); contada e distribuídas, em uma densidade de $2,5 \times 10^5$ células/poço em placas pré-tratadas com matrigel (0,1%) até atingirem o seu estado maduro (5-6 dias).

3.7. Cultura de células C2C12

A linhagem “imortal” de células de camundongos (C2C12, ATCC) foi cultivada em meio DMEM contendo soro fetal bovino (FBS) (10%) e antibióticos (penicilina/estreptomicina) (1%) a 37°C em incubadora de células contendo CO_2 (5%). Dois dias após o plaqueamento, as células foram induzidas à diferenciação em DMEM contendo soro de cavalo (HS) (2%) e antibióticos (1%) durante 4 dias. O meio foi mudado a cada 48 horas. No 5º dia da diferenciação, as células foram incubadas por 24 h com AICAR (250 μM) ou ácido palmítico (500 ou 700 μM contendo albumina (1%) livre de ácidos graxos. A solução estoque de ácido palmítico (100 mM) foi preparada em etanol (Hommelberg et al. 2009).

3.8. Cultura de células HEK293

A linhagem “imortal” de células embrionárias de rim de humanos (HEK293, ATCC) foi cultivada em meio DMEM contendo FBS (10%) e penicilina/estreptomicina (1%) a 37 °C em incubadora de células contendo CO₂ (5%). Todos os experimentos nestas células foram realizados logo após alcançarem 70% de confluência.

3.9. Transfecção de siRNA, miR e anti-miR em células C2C12

As células C2C12 foram transfectadas no 3° dia de diferenciação utilizando o reagente de RNAiMAX de Lipofectamina como recomendado pelo fabricante (Invitrogen-Life Technologies). O siRNA contra SNARK ou sequências misturadas foi obtido a partir de Origene (SR30004, SR418439B). As sequências *miR-696*, *anti-miR-696* e controle foram fornecidas pela empresa miRIDIAN™ (Dharmacon-GE).

3.10. Transfecção de plasmídeos

Células de cultura primária de músculo de rato (miotubos) foram transfectadas com o plasmídeo PGC-1 α -3'UTR através do reagente Lipofectamina2000 em meio Opti-MEM® de acordo com o fabricante (Life Technologies). O complexo (PGC-1 α -3'UTR/Lipofectamina) foi adicionado à cultura celular no 3° dia de diferenciação (~60% de confluência). 12 horas após a transfecção, as células foram lavadas com PBS e o meio PGM foi adicionado. Os experimentos foram realizados no 5° dia de diferenciação. As células do grupo controle foram transfectadas com o vetor vazio pcDNA3 ou GFP.

Mioblastos C2C12, em meio DMEM contendo FBS (10%), foram submetidos ao protocolo de transfecção reversa utilizando o plasmídeo SNARK conjugado com o reagente Viromer Red em tampão E como recomendado pelo fabricante (Lipocalyx). 12 horas após a transfecção, as células foram lavadas com PBS e, em seguida adicionado meio DMEM contendo HS (2%). Os experimentos foram realizados 48 horas após realização da transfecção

reversa. As células do grupo controle foram transfectadas com o vetor vazio pcDNA3 ou GFP.

3.11. Ensaio repórter

Células HEK293 em meio DMEM contendo FBS (10%) foram co-transfectadas com GFP-3'UTR e RFP-miR696 ou RFP-miR30, e GFP-3'UTRmt e RFP-miR696 ou RFP-miR30. Para isto, utilizamos o reagente *Viromer Red* em tampão E (Lipocalyx) no intuito de formar o complexo Viromer Red/Plasmídeo. 24 horas após realização da co-transfecção, o meio foi trocado por meio DMEM (FBS 10%) com adição de 1 µg/mL de doxíciclina, a qual foi usada com objetivo de permitir a transcrição tempo-dependente do microRNA *miR-696*. 72 horas após a transfecção, as células foram fixadas com paraformaldeído (4%) e a fluorescência do GFP e RFP foram detectadas em Ex488/Em510 nm e Ex587/Em610 nm, respectivamente. Imagens foram obtidas após aumento de 40x através de microscópio de fluorescência (Zeiss, Alemanha) e quantificadas utilizando o *software ImageJ* (IJ 1.46r).

3.12. Western Blotting

As proteínas provenientes da cultura de células C2C12 e da cultura de células primárias de miócitos de rato foram coletadas com auxílio de tampão RIPA na presença de inibidores de fosfatases e proteases. As concentrações de proteínas foram determinadas através do reagente de Bradford (Bio-Rad) ou BCA (Invitrogen). O preparo das amostras foi realizado com adição de 25 µL do tampão de amostra 5x (Glicerol 50%, Tris 312,5 mM, DTT 250 mM, SDS 10%, Azul de Bromofenol 0,05%) em 100 µL de proteína total obtida. Logo após, as amostras foram incubadas por 5 min à 95 °C no aparelho Thermomixer Comfort (Eppendorf). O tampão utilizado para a corrida eletroforética foi o Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1% (p/v), pH 8,3, Sigma Aldrich). 30 µg de proteína isolada de células C2C12 e 100 µg de células de cultura primária de miócitos de rato foram aplicadas e separadas por eletroforese em gel de acrilamida (10%) em equipamento Mini-Transblot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) e, logo em seguida, transferidas para membrana de nitrocelulose

ou PVDF (GE Healthcare Life Sciences) usando o aparelho Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad). O bloqueio de ligações não específicas foi feito em tampão TBS-T (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween®20) com 10% de leite sem gordura durante 60 min. As membranas foram incubadas por 16 horas a 4 °C com o anticorpo primário: PGC-1alfa (Calbiochem, ST1202), p-Akt Serina-473 (Cell Signalling, # 9271), Akt total (Cell Signalling, # 9272), p-SNARK Treonina-208 (Abcam, ab126048), SNARK total (Abcam, ab107287) e β -actina, Sc-47778). Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP durante 60 min à temperatura ambiente. A ligação do anticorpo foi detectada utilizando o reagente ECL da fornecedora *Amersham (GE Healthcare Life Sciences)* como descrito pelo fabricante. As imagens foram obtidas utilizando o sistema de imagem *ChemiDoc* (Bio Rad) e a densitometria de banda de proteína foi determinada utilizando o *software ImageLab* (BioRad).

3.13. PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen) de acordo com o fabricante. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*. Para análises de PCR em tempo real, o RNA foi reversamente transcrito utilizando reagente *Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)*. A expressão relativa de mRNAs foi determinada após normalização utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001). A PCR quantitativa foi realizada utilizando o sistema de PCR em tempo real Applied Biosystems StepOne (Applied Biosystems). A tabela das sequências senso e antisenso dos genes analisado pode ser encontrada no Apêndice D.

3.14. qRT-PCR para MicroRNA

Foram produzidos 7,5 μ L de produtos de reação de cDNA a partir de 5 ng de RNA total utilizando primers stem-loop, específicos para *mmu-miR-696* e *mmu-SnoR-202*, e *Taqman miRNA Reverse Transcription* kit (Applied Biosystems). O cDNA foi, então, diluído (15X) e amplificado utilizando o ensaio

de miRNA de Taqman juntamente com o reagente Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) no aparelho ABI Prism 7000 (Applied Biosystems). *Mmu-SnoR-202* foi utilizado como gene constitutivo e a expressão de miRNAs foi quantificada através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001).

3.15. Consumo de Oxigênio em Miotubos

As células C2C12, com uma densidade de 1×10^6 , foram cultivadas em placas de cultura de 100 mm em 10 mL de meio DMEM (Sigma D5671-500ML) contendo FBS (10%). Após 48 horas, o meio celular foi substituído com 10 mL de meio DMEM (Sigma D5671-500ML) contendo HS (2%) e trocado a cada 48 horas. No 5º dia, as células foram tripsinizadas, centrifugadas ($1250 \times g$) e incubadas com 2 ml de meio de respiração I (Krebs Henseleit contendo glicose, 10 mM, e pH 7,3 a 37 °C) no aparelho Oxygraph-2k (O2k, OROBOROS Instruments). Durante a medição do consumo de oxigênio, oligomicina (1 µg/mL), um inibidor da proteína ATP sintase; e Carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona (CCCP) (1 µM), um desacoplador mitocondrial; foram utilizados para inibição da respiração e para a indução do desacoplamento mitocondrial, respectivamente.

3.16. Consumo de Oxigênio em Mioblastos

As células C2C12, com uma densidade de 2×10^4 células/poço, foram cultivadas em placas de cultura de células de 24 poços Seahorse XF (Seahorse Biosciences) com 350 µL de meio FBS (10%) e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂. 48 horas após, os experimentos foram iniciados substituindo o meio, pré-aquecido a 37 °C, por 675 µL de meio de respiração II sem adição de fenol (8,3 g/L de DMEM Base, 1,85 g/L de NaCl, 2 mM de GlutaMax-1, 1 mM de piruvato de sódio, 15 mM de D-glucose e HEPES 20 mM, pH 7,4). As células foram incubadas a 37 °C durante 60 min antes da primeira medição. Durante a realização do consumo de oxigênio, oligomicina (1 µg/mL), um inibidor da proteína ATP sintase; e carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona (1 µM), um desacoplador mitocondrial; e rotenona (0,1 µM), um inibidor do

complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial; foram adicionados como controles internos.

3.17. Determinação da produção de ROS (H₂O₂)

Células C2C12 foram mantidas a 37 °C em PBS contendo glicose (5,6 mM), sonda fluorescente Amplex ultra-red (50 µM) ou *horseradish peroxidase* (HRP) (0,1 U/mL) durante 60 min. O meio foi recolhido e a intensidade de fluorescência determinada a 568 nm de excitação e 581 nm de emissão. As células foram transfectadas com *Scramble* (controle), ou mimic do *miR-696*, ou anti-*miR-696*. Em seguida incubadas na presença ou ausência de palmitato (700 µM), exceto as células transfectadas com o mimic do *miR-696*. Os antioxidantes glutathione (GSH) mais glutathione peroxidase foram utilizados como controles negativos.

3.18. Intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)

As células C2C12, com uma densidade de 2×10^5 células/poço, foram cultivadas em placas de cultura de células de 6 poços. Após a diferenciação, as células foram recolhidas com a adição de ácido perclórico (0,5 M) e depois centrifugadas a 7000 x g durante 10 min. O pH de cada amostra foi ajustado para 7,3 com KHCO₃. Para a detecção de citrato, utilizou-se tampão Tris-EDTA (pH 8) a 25 °C em reação na presença do substrato NADH (450 µM) diluído em tampão carbonato (pH 9), citrato liase (8,8 mU/mL) e malato desidrogenase (260 mU/mL) diluído em PBS sem cálcio (pH 7,3). Para detectar α-cetoglutarato, utilizou-se tampão fosfato em pH 6,8 e 25°C em reação na presença de glutamato desidrogenase (9 U/mL), amônia (36 mM), ADP (2 mM) e NADH (450 µM). Para detectar o malato, utilizou-se tampão hidrazina-glicina (pH 9) a 37°C em reação na presença de malato desidrogenase (0,6 U/mL) e NAD⁺ (15 mM). Para detecção de oxaloacetato, utilizou-se tampão fosfato (pH 6,8) a 25 °C em reação na presença de malato desidrogenase (0,22 U/mL) e substrato de NADH (450 µM). As curvas padrões foram construídas de acordo com o consumo/produção de NADH determinado pela emissão em 360 nm e excitação em 460 nm.

3.19. Conteúdo de ATP

A mensuração de ATP foi realizada em células C2C12 expostas a AICAR (250 μ M) ou ácido palmítico (500 μ M e 700 μ M) utilizando um kit de ensaio ATP (Sigma-Aldrich, Número de Cat. FLAA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

3.20. Aprovação do Estudo

Os experimentos com os animais transgênicos para SNARK foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais do *Joslin Diabetes Institute* (Boston, EUA) e com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (8ª edição, National Academies Press, 2011). Os procedimentos para indução de diabetes por STZ e para isolamento de células de ratos foram aprovados pelo Comitê Ético Institucional para o uso de animais de laboratório do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Aprovado nº 092/2010 e 130/2012, respectivamente).

3.21. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e analisados por teste t ou one-way ANOVA seguido por teste post-Tukey. $P \leq 0,05$ foi tomado como critério de significância mínimo.

Resultados

4. Resultados

4.1. Análise bioinformática dos microRNAs com afinidade à região 3'UTR do mRNA de PGC-1 α

PGC-1 α foi identificada como um dos principais fatores de transcrição responsáveis pela regulação da biogênese mitocondrial. Sua baixa expressão está altamente correlacionada com a obesidade e resistência à insulina (Patti et al. 2003; Zhang et al. 2013; Greene et al. 2015; Mootha et al. 2003). Estudos prévios sugeriram que a disfunção mitocondrial em células musculares esqueléticas pode estar associada a defeitos na regulação de um grande número de genes metabólicos incluindo o gene PGC-1 α . O RNA mensageiro do PGC-1 α tem 6464 nucleotídeos (nt) de comprimento e somente a sequência da região 3'UTR apresenta 3931 nt, podendo ser regulado por diversos miRs. Devido sua importância metabólica e sua possibilidade de interagir com miRs, nosso objetivo inicial foi descobrir um microRNA que apresentasse forte correlação com o RNA mensageiro do PGC-1 α , pela análise da variação de energia livre de hibridização (ΔG).

Inicialmente, realizamos uma análise “*in silico*” através da ferramenta *online* Sfold2.2 (<http://sfold.wadsworth.org/>) para determinar quais miRs (HITS-CLIP; NCBI RefSeq Construir 37,2), poderiam se ligar à região 3'UTR do RNA mensageiro do PGC-1 α . Dos 219 candidatos (Apêndice A), o *miR-696* apresentou o quarto menor valor (-29,8 kcal/mol) de ΔG em relação a sequência 3'UTR do PGC-1 α (Figura 6). Dos 5 miRs com maior afinidade ao mRNA do PGC-1 α , apenas o *miR-696* já havia sido relatado por regular a expressão de PGC-1 α em músculo esquelético de camundongos exercitados ou imobilização (Aoi et al. 2010). Enquanto poucas informações a respeito dos outros 4 miRs foram publicadas. Sendo assim, resolvemos investigar o envolvimento do *miR-696* com a função mitocondrial e o diabetes.

Figura 6. Análise bioinformática dos microRNAs com afinidade à 3'UTR do mRNA de PGC-1 α

Análise “*in silico*” usando a ferramenta de bioinformática Sfold 2.2 (<http://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/index.pl>) foi conduzida para determinar todos os possíveis microRNAs já descritos em camundongos (*Mus musculus*) que, possivelmente, se ligam à região 3'UTR do RNA mensageiro do gene PGC-1 α . A energia livre de hibridização (ΔG) entre o microRNA e a sequência 3'UTR do PGC-1 α indica a afinidade da interação física entre estas moléculas. Um corte inferior a -20 kcal/mol foi aplicado para fins ilustrativos.

4.2. *PGC-1α* é alvo de *miR-696*

4.2.1. Superexpressão da *PGC-1α* e do *miR-696* em cultura primária de células musculares de ratos

O pareamento entre a fita do mRNA e do microRNA necessita da existência de uma região altamente específica presente no microRNA, denominada região *seed*. A região *seed* compreende os nucleotídeos 2-8 a partir da extremidade 5' do microRNA e representa um dos requisitos para que haja perfeita complementariedade entre as duas fitas de RNA. O sítio de interação do *PGC-1α* (5' 2778-2810 nt 3') onde ocorre o pareamento com o *miR-696* apresenta-se altamente conservado entre diversas espécies incluindo camundongos, chimpanzé e humanos (Anexo I; Site_C). Além da 3'UTR de *PGC-1α*, a sequência de 7 nucleotídeos da região *seed* do *miR-696* também é bastante conservada (Anexo I; Seed_C). Além do pareamento total com a região *seed*, outros 5 nucleotídeos à esquerda da região 3'UTR (**CAGUAA**) apresentam complementariedade com *miR-696* (Figura 7).

Figura 7. Esquema da interação entre a região 3'UTR do *PGC-1α* e o *miR-696*

A sequência da região 3'UTR do *PGC-1α* apresenta forte conservação em diferentes espécies (camundongos, chimpanzé, humano, entre outros). A sequência madura do *miR-696* apresenta pareamento completo com o a sequência do *PGC-1α* na região *seed*.

4.2.2. Efeito da superexpressão e inibição do *miR-696* na expressão da PGC-1 α

Determinamos a expressão da proteína PGC-1 α em cultura de células primárias de rato co-transfectadas com plasmídeo contendo a sequência do gene de PGC-1 α e o oligonucleotídeo mimético da sequência madura de 18 nt do *miR-696*. Observou-se que os níveis da proteína PGC-1a foram significativamente reduzidos de modo independente da concentração do do *miR-696*, indicando que, nas concentrações de 5, 10 e 20 pmol, o *miR-696* é um forte repressor de PGC-1 α (Figura 8A). Em contrapartida, células C2C12 previamente transfectadas com a sequência antisense (ASO) do *miR-696* apresentaram aumento gradual, até a concentração de 20 pmol, na expressão de PGC-1a mesmo após o tratamento com 700 μ M de ácido palmítico (Figura 8B).

A

B

Figura 8. Superexpressão da PGC-1 α e do *miR-696* em cultura primária de células musculares de ratos

(A) Cultura primária de células de ratos foram transfectadas com a sequência completa do plasmídeo de PGC-1 α ao terceiro dia de diferenciação e, em seguida, no quarto dia de diferenciação, transfectadas com diferentes concentrações de oligonucleotídeo da sequência madura do *miR-696*. Proteínas foram coletadas 24 horas após a realização da última transfecção e separadas por peso molecular em gel de poliacrilamida (10% SDS) para detecção da proteína PGC-1 α (100 μ g de proteína foram carregados). (B) Células C2C12 foram transfectadas no terceiro dia de diferenciação com diferentes concentrações de oligonucleotídeo da sequência atinsenso da fita madura do *miR-696*. Em seguida, no quarto dia de diferenciação, tratadas com 700 μ M de palmitato ou 0,1% de etanol (Controle) durante 24 horas. Proteínas foram coletadas 24 horas após o tratamento com palmitato e separadas pelo peso molecular em gel de poliacrilamida (10% SDS) para detecção da proteína PGC-1 α (100 μ g de proteína foram carregados). Em A e B, o anticorpo contra β -actin foi utilizado com controle interno (n=2).

4.2.3. Ensaio repórter para confirmação da interação entre PGC-1 α e *miR-696*

A fim de investigar a interação física entre o *miR-696* e a sequência 3'UTR do PGC-1 α , foi realizada a clonagem da região 3'UTR do RNA mensageiro do PGC-1 α , contendo a sequência específica de interação com o *miR-696* (5' 2778-3178 nt 3'), após a sequência do gene da proteína GFP (*Green Fluorescence Protein*) no vetor pGFP (GFP-PGC1-3'UTR). Também foi realizada a clonagem da sequência acima citada com mutações pontuais nos nucleotídeos 3-4 (CA) da região *seed* do RNA mensageiro do PGC-1 α (AGGTCAC) para posterior inserção desta sequência no plasmídeo pGFP (GFP-PGC1-3'UTRmt). Além disso, inserimos a sequência referente ao gene do *miR-696* em um vetor pRFP (RFP-miR696) a fim de expressar a sequência *short-hairpin* deste microRNA. Como controle interno destes experimentos utilizamos o microRNA miR-30 (RFP-miR30), pois este não exerce efeito algum na expressão de PGC-1 α , nem possui afinidade com a sequência 3'UTR do mesmo. Sendo assim, realizamos um ensaio repórter superexpressando, por meio de co-transfecção, os plasmídeos RFP-miR696 e GFP-PGC1-3'UTR em células HEK 293. Como esperado, o sinal de fluorescência da GFP reduziu nas células que superexpressam o *miR-696* quando comparado tanto com o vetor controle (RFP-miR30) quanto com o vetor GFP-PGC1-3'UTRmt (Figura 9 A e B).

Figura 9. Ensaio repórter para confirmação da interação entre PGC-1 α e *miR-696*

(A) Células HEK293 foram co-transfectadas com os plasmídeos RFP-*miR-696* e GFP-PGC-1 α -3'UTR ou RFP-*miR-696* e GFP-PGC-1 α -3'UTRmt; *miR-30* e GFP-PGC-1 α -3'UTR foram usados como controle negativo (CN). (B) O sinal de fluorescência da proteína GFP foi mensurado para quantificar a interação entre o *miR-696* a região 3'UTR do PGC-1 α . O microRNA *miR-30* foi utilizado como controle negativo. Estatística, ** $p < 0,01$ vs. Controle (*t-test*); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM ($n = 3$).

4.3. O perfil de expressão do *miR-696* possui correlação negativa direta com a expressão da PGC-1 α no músculo esquelético

4.3.1. Expressão relativa do *miR-696* e do PGC-1 α em tecidos musculares esqueléticos com características metabólicas opostas

Estudos anteriores relataram que, tanto os níveis de proteínas, como de mRNA de PGC-1 α são mais abundantes em fibras do músculo esquelético com características mais oxidativas (tipo I) do que glicolíticas (tipo II). Além disso, a superexpressão de PGC-1 α , em cultura de células musculares, foi responsável pela conversão de fibras do tipo II para fibras do tipo I (Rasbach et al. 2010; Schuler et al. 2006; Lin et al. 2002).

A fim de examinar a correlação entre PGC-1 α e *miR-696*, examinamos suas respectivas expressões no músculo *soleus*, classicamente reconhecido por ser majoritariamente composto de fibras oxidativas; e nos músculos EDL e TA, classicamente reconhecidos por possuírem predominantemente fibras glicolíticas. Como esperado, a expressão do PGC-1 α foi mais abundante nos músculos *soleus* (3 a 4 vezes) em comparação com os músculos EDL e TA (Figura 10A). Por outro lado, a expressão do *miR-696* foi significativamente maior nos músculos EDL e TA (1,5 e 2,5 vezes, respectivamente) quando comparados com o músculo *soleus* (Figura 10B). Além disso, a análise de correlação da expressão entre o PGC-1 α e o *miR-696* por regressão linear mostrou um $R^2 = 0,48$, sendo $P < 0,0001$ (Figura 10C).

Figura 10. Expressão relativa dos genes *miR-696* e *PGC-1α* em tecidos musculares esqueléticos com características metabólicas opostas

(A) Expressão relativa do *PGC-1α* foi mensurada nos músculos esqueléticos *soleus*, EDL e TA de camundongos C57BL/6, relativo ao gene constitutivo GAPDH (n=6 por grupo). (B) Expressão relativa do *miR-696* foi mensurada nos músculos esqueléticos *soleus*, EDL e TA de camundongos C57BL/6, relativo ao gene constitutivo *SnoR-202* (n=6 por grupo). (C) Correlação entre *PGC-1α* e *miR-696* usando regressão linear. $P < 0,0001$. Estatística, * $p < 0,05$ vs. Controle (one-way ANOVA); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM (n = 3).

4.3.2. Expressão relativa do *miR-696* e do PGC-1 α nos tecidos baço, rim, tecidos adiposos branco e marrom em camundongos

Avaliamos a expressão do *miR-696* e do PGC-1 α em outros tecidos de camundongos que não fossem tecido muscular esquelético. Já foi observado que a expressão de PGC-1 α está drasticamente reduzida no baço, enquanto que o rim apresenta altos valores na expressão desse gene. Dessa forma usamos esses dois tecidos como controles positivo e negativo da expressão de PGC-1 α . Além disso, analisamos a expressão de PGC-1 α em dois tecidos com diferentes perfis metabólicos: o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM). Em seguida, usamos os mesmos tecidos para avaliar a expressão do *miR-696* no intuito de observar a mesma correlação negativa vista nos tecidos musculares esqueléticos. Interessantemente, a expressão do *miR-696* e PGC-1 α nos tecidos adiposo apresentou a mesma relação observada no *soleus* e TA. Assim como o *soleus*, o TAM, também é reconhecido pela alta capacidade oxidativa e pelos elevados níveis de expressão de PGC-1 α . A expressão do *miR-696* no TAM apresentou menores valores de expressão relativos à expressão de PGC-1 α em comparação com o TAB. Da mesma forma como o TA possui características menos oxidativas do que o *soleus*, o TAB também apresenta a mesma característica em comparação com o TAM (Figura 11).

Figura 11. Expressão relativa dos genes *miR-696* e *PGC-1α* nos tecidos baço, rim, tecidos adiposos branco e marrom em camundongos

Expressão relativa do *PGC-1α* foi mensurada nos tecidos baço, rim, tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM) de camundongos C57BL/6, relativo ao gene constitutivo *RPL39*. $P < 0,0001$. Estatística, * $p < 0,05$ vs. Controle (one-way ANOVA); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM ($n=5$ por grupo).

4.3.3. Expressão relativa dos genes *miR-696* e *PGC-1 α* em camundongos submetidos ao tratamento com estreptozotocina

Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao tratamento com estreptozotocina (STZ) para o desenvolvimento do diabetes tipo 1 (Whitman et al. 2013). Inicialmente foi realizada avaliação no peso corporal, bem como nos níveis totais de insulina sérica e de glicose sanguínea. Foi observado que os animais tratados com STZ apresentaram redução no peso corporal total ($29,4 \pm 0,89$) quando comparados aos animais controle ($33 \pm 0,71$). Também houve redução nos níveis séricos de insulina ($0,37 \pm 0,1$) em relação ao grupo controle ($1,71 \pm 0,74$). Já a glicose sanguínea apresentou níveis extremamente elevados nos animais tratados com STZ ($408,67 \pm 22,75$) em comparação aos animais controles ($147,60 \pm 9,61$) (Tabela 1). Além disso, observamos redução de aproximadamente 68% na expressão relativa de *PGC-1 α* no músculo esquelético de ratos induzidos ao diabetes por STZ, ao passo que a expressão do *miR-696* aumentou cerca de 70% no grupo tratado com STZ (Figura 12).

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos em camundongos C57BL/6 controle e tratados com estreptozotocina (STZ)

	Controle	STZ
Peso Corporal (g)	$33 \pm 0,71$	$29,4 \pm 0,89$ **
Insulina Sérica (ng/mL)	$1,71 \pm 0,54$	$0,37 \pm 0,1$ ***
Glicose Sanguínea (mg/dL)	$147,60 \pm 9,61$	$408,67 \pm 22,75$ ***

Tabela 1. Mensurações sanguíneas em camundongos tratados com estreptozotocina.

Peso corporal, insulina sérica e glicose sanguínea foi medidas em camundongos C57BL/6 tratados com injeção intravenosa contendo DMSO/salina (Controle) ou estreptozotocina (STZ, 70 mg.kg⁻¹) em jejum, em ambos os casos, 3 dias antes do sacrifício. Estatística, **p < 0,01 vs. Controle (*t-test*) (n = 5 por grupo).

Figura 12. Expressão relativa dos genes *miR-696* e *PGC-1α* em camundongos submetidos ao tratamento com estreptozotocina

Expressão relativa dos genes *PGC-1α* e *miR-696*, relativos aos genes constitutivos *RPL39* e *SnoR-202*, respectivamente, foi mensurada em músculo esquelético TA de camundongos C57BL/6 tratados com injeção intravenosa contendo DMSO/salina (Controle) ou estreptozotocina (STZ, 70 mg.kg⁻¹) em jejum, em ambos os casos, 3 dias antes do sacrifício. Estatística, *p < 0,05 vs. Controle (*t-test*); as barras foram representadas por média ± EPM (n = 5 por grupo).

4.3.4. Expressão relativa dos genes *miR-696* e *PGC-1 α* em camundongos submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica

Para o desenvolvimento do diabetes tipo 2, camundongos C57BL/6 foram submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica (DHL), na qual 60% do conteúdo energético era proveniente de lipídeos. Inicialmente foi realizada avaliação no peso corporal, nos níveis totais de insulina, ácidos graxos livres e triglicerídeos séricos, bem como da glicose sanguínea no estado de jejum (Tabela 2). Foi observado que os animais tratados com DHL: 1) aumentaram o peso corporal total ($48,62 \pm 1,4$) quando comparados aos animais controle ($28,12 \pm 0,74$); 2) aumentaram os níveis séricos de ácidos graxos livres ($0,87 \pm 0,032$) em comparação com os animais controle ($0,62 \pm 0,048$); 3) apresentaram redução nos níveis séricos de TG ($38,49 \pm 2,69$) quando comparados ao grupo controle ($46,39 \pm 4,08$); 4) aumentaram os níveis séricos de insulina ($5,55 \pm 1,02$) em relação ao grupo controle ($1,539 \pm 0,19$); 5) aumentaram os níveis de glicose sanguínea ($248,33 \pm 8,29$) em comparação com os animais controle ($207 \pm 10,17$). Além disso, observamos redução de, aproximadamente, 30% na expressão relativa de *PGC-1 α* no músculo esquelético de camundongos induzidos ao diabetes através de DHL. Concomitantemente, a expressão do *miR-696* aumentou cerca de 70% no grupo tratado com DHL (Figura 13).

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos em camundongos C57Bl/6 controle e tratados com dieta hiperlipídica (DHL)

	Controle	HFD
Peso Corporal (g)	28,12 ± 0,74	48,62 ± 1,4 **
Ácidos Graxos Livres (nmol/L)	0,62 ± 0,048	0,87 ± 0,032 **
Triglicerídeos (mg/mL)	46,39 ± 4,08	38,49 ± 2,69 **
Insulina Sérica (ng/mL)	1,539 ± 0,19	5,55 ± 1,02 ***
Glicose Sanguínea (mg/dL)	207 ± 10,17	248,33 ± 8,29 ***

Tabela 2. Mensurações sanguíneas em camundongos tratados com dieta hiperlipídica.

Peso corporal, níveis totais de insulina, ácidos graxos livres, triglicerídeos e glicose sanguínea foram medidos em camundongos C57BL/6 tratados com dieta padrão composta de 20% de energia de fonte protéica, 70% de carboidratos e 10% de gorduras (Controle); e camundongos C57BL/6 tratados durante 12 semanas com dieta hiperlipídica composta de energia de fonte de proteínas (20%), carboidratos (20%) e gorduras (60%) (DHL). Estatística, **p < 0,01 vs. Controle (*t-test*) (n = 5 por grupo).

Figura 13. Expressão relativa dos genes *miR-696* e *PGC-1α* em camundongos submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica

Expressão relativa dos genes *PGC-1α* e *miR-696* relativos aos genes constitutivos *RPL39* e *SnoR-202*, respectivamente, foi mensurada em músculo esquelético TA de camundongos C57BL/6 tratados com DHL ou dieta padrão durante 12 semanas. Estatística, * $p < 0,05$ vs. Controle (*t-test*); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM ($n = 5$ por grupo).

4.3.5. Expressão relativa do gene *miR-696* em células C2C12 durante a diferenciação

Em 2013, Adamovich e colaboradores relataram que os níveis da proteína PGC-1 α são reduzidos gradativamente ao longo da diferenciação em células musculares C2C12 (Adamovich et al. 2013). Curiosamente, essas mesmas células apresentaram um aumento cinco vezes maior na transcrição do *miR-696* após o quarto dia de diferenciação quando comparadas com mioblastos pré-diferenciados (Figura 14).

Figura 14. Expressão relativa do gene *miR-696* em células C2C12 durante a diferenciação
Expressão relativa do gene *miR-696*, relativo ao gene constitutivo *SnoR-202*, foi mensurado em células C2C12 sem (CN) e com adição de soro de cavalo (2%) nos dias 1, 2, 3 e 4. Estatística, * $p < 0,05$ vs. controle negativo (one-way ANOVA, pós teste Tukey); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM ($n = 5$).

4.4.A inibição do *miR-696* sob os efeitos deletérios provocados pela exposição à altas concentrações de palmitato

4.4.1. Expressão relativa dos genes *miR-696* e PGC-1 α em células C2C12 expostas à altas concentrações de palmitato

O tratamento de cultura de células do músculo esquelético com palmitato é um método muito consistente para indução da disfunção mitocondrial e da resistência à insulina (Anderson et al. 2009; Barbosa et al. 2013). Nossos resultados demonstraram que células C2C12 expostas à 700 μ M de palmitato durante 24 horas apresentaram redução de 38% na expressão de PGC-1 α e aumento, em torno de 3 vezes, na expressão do *miR-696* (Figura 15).

Figura 15. Expressão relativa dos genes *miR-696* e PGC-1 α em células C2C12 submetidos ao tratamento com palmitato

Expressão relativa dos genes PGC-1 α e *miR-696* relativos aos genes constitutivos *RPL39* e *SnoR-202*, respectivamente, foi mensurada em células musculares C2C12 tratadas com 700 μ M de palmitato ou 0,1% de etanol (Controle). Estatística, *p < 0,05 vs. Controle (*t-test*); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM (n = 5 por grupo).

4.4.2. Expressão relativa dos genes relacionados à mitocôndria após transfecção com o mimético ou o inibidor do *miR-696*

Também observamos diminuição na expressão do PGC-1 α após transfecção de células C2C12 com o mimético da sequência madura do *miR-696*. Da mesma forma, o tratamento com palmitato reprimiu a expressão de PGC-1 α e dos genes associados como processo de biogênese mitocondrial, incluindo *TFAM*, *CYT C*, *COX5A*, e *CS*. Em contrapartida, a transfecção de células C2C12 com a sequência antisenso (ASO) do *miR-696*, 24 horas antes da exposição com 700 μ M de palmitato, foi capaz de recuperar a expressão de PGC-1 α e dos genes *TFAM*, *CYT C* e *COX5A*. Mais ainda, foi responsável por um aumento significativo na expressão de *CS* em comparação com células controles (**Figura 16**).

Figura 16. Expressão relativa dos genes relacionados à mitocôndria após transfecção com o mimético ou o inibidor do *miR-696*

Expressão relativa dos genes PGC-1 α , *TFAM*, *CYT C*, *COX5A*, e *CS* (citrito sintase), relativa ao gene constitutivo *RPL39*, foi mensurada em células musculares C2C12 transfectadas com o mimético (*miR-696* Oligo) ou o inibidor do *miR-696* tratadas com 700 μ M de palmitato (Palmitato + *miR-696* ASO). Células também foram tratadas somente com 700 μ M de palmitato (Palmitato) ou 0,1% de etanol (Controle). Estatística, ^{a,b} $p < 0,05$ vs. Controle (one-way ANOVA, pós teste Tukey); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM ($n = 5$).

4.4.3. Emissão de peróxido de hidrogênio após transfecção com o mimético ou o inibidor do *miR-696*

Observamos, também, que houve aumento significativo na emissão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em decorrência ao tratamento com 700 μM de palmitato. Enquanto isso, a transfecção prévia com o *miR-696* ASO em células tratadas com palmitato apresentaram redução na emissão de H_2O_2 em comparação ao grupo palmitato. Entretanto, não foi possível observar alteração na emissão de peróxido de hidrogênio em células C2C12 transfectadas com o mimético do *miR-696* (Figura 17).

Figura 17. Emissão de peróxido de hidrogênio após transfecção com o mimético ou o inibidor do *miR-696*

Conteúdo de peróxido de hidrogênio extracelular determinado pela sonda fluorescente amplex ultra-red foi mensurada em células musculares C2C12 transfectadas com o mimético (*miR-696* Oligo) ou o inibidor do *miR-696* tratadas com 700 μM de palmitato (Palmitato + *miR-696* ASO). Células também foram tratadas somente com 700 μM de palmitato (Palmitato) ou 0,1% de etanol (Controle). Estatística, ^{a,b,c} $p < 0,05$ vs. Controle (one-way ANOVA, pós teste Tukey); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM ($n = 6$).

4.4.4. Consumo de oxigênio após transfecção com o mimético ou o inibidor do *miR-696*

Levando em consideração a relação existente entre a função mitocondrial e a expressão de PGC-1 α , mensuramos a respiração celular em diferentes condições, incluindo a respiração mitocondrial basal; a respiração na presença de oligomicina e a respiração mitocondrial máxima induzida pela adição do desacoplador CCCP. Tanto o tratamento com palmitato, como a transfecção com o mimético do *miR-696* reduziram a taxa de respiração mitocondrial no estado basal. Somente o grupo *miR-696* Oligo apresentou alteração na respiração celular em comparação ao grupo controle. Além disso, observamos que a respiração máxima reduziu, exclusivamente, nas células tratadas com palmitato quando comparadas às células controle. Entretanto, o tratamento com o *miR-696* ASO foi capaz de recuperar o prejuízo no consumo de oxigênio, no estado máximo, gerado pela sobrecarga de palmitato (Figura 18).

Figura 18. Consumo de oxigênio após transfecção com o mimético ou o inibidor do *miR-696*

Taxa no consumo de oxigênio nos estados basal, mínimo, na presença de oligomicina (1 $\mu\text{g/mL}$), e máximo, na presença de FCCP (1 μM), de células musculares C2C12 transfectadas com o mimético (*miR-696* Oligo) ou o inibidor do *miR-696* tratadas com 700 μM de palmitato (Palmitato + *miR-696* ASO). Células também foram tratadas somente com 700 μM de palmitato (Palmitato) ou 0,1% de etanol (Controle). Estatística, ^{a,b} $p < 0,05$ vs. Controle (one-way ANOVA, pós teste Tukey); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM ($n = 6$).

4.4.5. Fosforilação da proteína Akt após transfecção com o mimético ou o inibidor do *miR-696*

Em seguida, buscamos compreender se o *miR-696* poderia prejudicar a sinalização à insulina, já que PGC-1 α participa na transcrição de GLUT4 (Michael et al. 2001) e na captação de glicose (McGee et al. 2008; Jäger et al. 2007). Recentemente, demonstramos em nosso laboratório que, o tratamento de células musculares primárias de ratos com palmitato (700 μ M) reduziu a fosforilação do resíduo Serina-473 da proteína Akt (Barbosa et al. 2013), a qual tem sido associada à translocação de GLUT4 para a membrana celular externa (Tsuchiya et al. 2014). Foi possível observar a redução na fosforilação de Akt (Serina-473) através do uso de insulina em células previamente tratadas com palmitato em comparação com células controle. Enquanto isso, células transfectadas com o mimético do *miR-696* apresentaram uma tendência na redução da fosforilação de Akt (Serina-473). Ainda, células transfectadas com o *miR-696* ASO mostraram uma pequena recuperação, porém não estatística, na fosforilação de Akt (Figuras 19 A e B). Estes achados sugerem que o controle molecular da expressão do *miR-696* pode regular a função mitocondrial em células do músculo esquelético por meio de um mecanismo dependente de PGC-1 α . Todavia, nestas mesmas condições, não foi possível observar alterações significativas na fosforilação de Akt no resíduo serina-473.

Figura 19. Fosforilação da proteína Akt após transfecção com o mimético ou o inibidor do *miR-696*

(A) *Western Blot* da Akt total e fosforilada, no resíduo Serina-473 na presença ou ausência de insulina (100 nM), em células musculares C2C12 transfectadas com o mimético (*miR-696* Oligo) ou o inibidor do *miR-696* tratadas com 700 μ M de palmitato (Palmitato + *miR-696* ASO). Células também foram tratadas somente com 700 μ M de palmitato (Palmitato) ou 0,1% de etanol (Controle). β -actina foi usada como controle interno; (B) Gráfico de barras representativo das imagens de *Western Blot*. Estatística, *p < 0,05 vs. Controle (*t-test*); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM (n = 3).

4.5. AMPK não regula a expressão do *miR-696* em células do músculo esquelético

4.5.1. Concentração de ATP em células C2C12 expostas ao palmitato e AICAR

AMPK realiza papel crucial na biogênese mitocondrial induzida pelo exercício físico através da fosforilação direta de PGC-1 α (Jäger et al. 2007). Recentemente, foi relatado que a expressão do *miR-696* em músculo esquelético de camundongo reduz após a realização de exercício físico crônico e aumenta após 5 dias de imobilização (Aoi et al. 2010). Além disso, AMPK tem sido envolvida na sinalização metabólica como mediadora do sinal retrógrado mitocondrial (Friis et al. 2014; Ho et al. 2013). Sendo assim, realizamos uma série de experimentos utilizando um ativador de AMPK, *5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside* (AICAR), o qual possui como efeitos a estimulação da atividade da AMPK (Dugan et al. 2013) e poderia estar envolvido no aumento da função mitocondrial.

Inicialmente, observamos que células C2C12 expostas a 250 μ M de AICAR ou 700 μ M de palmitato durante 24 horas mostraram redução na produção de ATP, todavia este efeito não foi observado após o tratamento com 500 μ M de palmitato (Figura 20). Esses resultados sugerem que AMPK pode estar envolvida na disfunção mitocondrial assim como na sobrecarga metabólica com 700 μ M de palmitato devido a redução na concentração de ATP.

Figura 20. Concentração de ATP após tratamentos com AICAR de diferentes concentrações de palmitato

A concentração de ATP foi mensurada após o tratamento com AICAR (250 μ M) ou palmitato (500 μ M ou 700 μ M) em células C2C12. 0,1% Etanol e 1% de BSA foram usados nas células controles. Estatística, ^{a,b} $p < 0,05$ vs. Controle (one-way ANOVA, pós teste Tukey); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM (n=2).

4.5.2. Efeito do tratamento com palmitato ou AICAR na função mitocondrial de células C2C12

O tratamento com AICAR induziu a expressão de PGC-1 α quando comparado com células controle. Enquanto isso, miotubos tratados com 700 μ M de palmitato por 24 horas apresentaram redução de 40% na expressão do gene de PGC-1 α . Apesar do aumento nos níveis do *miR-696* em células expostas a 700 μ M de palmitato, não observamos nenhuma alteração na expressão deste microRNA após o tratamento com AICAR (Figura 21A). Após tratamento com palmitato, observamos redução na concentração de alguns dos metabólitos do ciclo do ácido cítrico (oxalacetato, citrato, α -cetoglutarato e malato) quando comparados com o grupo controle. Enquanto, notamos aumento nas concentrações de citrato e malato em comparação ao controle (Figura 21B). Como já havíamos demonstrado anteriormente, células C2C12 apresentaram redução da respiração mitocondrial, no estado basal e máximo, após tratamento com 700 μ M de palmitato. Entretanto, não encontramos alterações no consumo de oxigênio após tratamento de células C2C12 com 250 μ M de AICAR em todos os estados de respiração investigados: basal, mínimo e máximo (Figura 21C). Esses resultados sugerem que o AICAR não exerce controle sobre a função mitocondrial, mesmo induzindo um aumento no fluxo do ciclo do ácido cítrico.

Figura 21. Efeito dos tratamentos com palmitato ou AICAR na função mitocondrial

(A) Expressão relativa dos genes PGC-1 α e *miR-696* relativos aos genes constitutivos *RPL39* e *SnoR-202*, respectivamente; (B) Concentração relativa dos intermediários do TCA (oxalacetato, citrato, α -cetoglutarato e malato); (C) Taxa de consumo de oxigênio nos estados basal, mínimo, na presença de oligomicina (1 μ g/mL), e máximo, na presença de FCCP (1 μ M). A, B e C foram mensurada em células musculares C2C12 tratadas com 250 μ M de AICAR ou 700 μ M de palmitato ou 0,1% de etanol (Controle). Estatística, ^{a,b,c} $p < 0,05$ vs. Controle (one-way ANOVA, pós teste Tukey); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM ($n=5$); ns = sem diferença estatística.

4.5.3. Expressão de PGC-1 α e *miR-696* em músculo esquelético de camundongos com AMPK cronicamente ativa ou inativa

Após resultados opostos à nossa hipótese, quando acreditamos que o ativador de AMPK, AICAR, poderia estar envolvido na regulação da expressão do *miR-696* em um mecanismo dependente de AMPK, buscamos confirmar se essa mesma relação ocorria em camundongos transgênicos para AMPK, especificamente no músculo esquelético. Duas linhagens diferentes de camundongo transgênicos foram utilizadas para confirmar a hipótese inicial de que AMPK participa na regulação da transcrição do *miR-696* e, indiretamente, altera a expressão de PGC-1 α . A primeira linhagem investigada era caracterizada por camundongos com AMPK cronicamente ativa (AMPK γ 3 R70Q). Nestes animais, foi realizada uma mutação no resíduo 70 da proteína AMPK através da troca de um aminoácido arginina (R) por um aminoácido glutamina (Q). Já na outra linhagem investigada, foi realizado uma mutação no resíduo 157 da proteína AMPK através da troca de um aminoácido aspartato (D) por um aminoácido alanina (A) com objetivo de inibir a fosforilação do domínio quinase da proteína AMPK, consequentemente, reduzindo sua atividade (AMPK α 2 DN). A partir dos resultados obtidos dessas duas linhagens foi possível observar que a expressão do PGC-1 α não foi alterada nos animais com AMPK ativa. Por outro lado, os animais com AMPK inativa apresentaram redução na expressão do PGC-1 α . Por último, ambas as linhagens não alteraram a expressão do *miR-696* (Figura 22). Juntos, estes resultados nos sugerem que AMPK não participa da via de sinalização que regula a expressão do *miR-696* em células do músculo esquelético.

Figura 22. Expressão relativa dos genes *miR-696* e *PGC-1 α* em camundongos transgênicos para AMPK

Expressão relativa dos genes *PGC-1 α* e *miR-696*, relativos aos genes constitutivos *GAPDH* e *SnoR-202*, respectivamente, foi mensurada em músculo esquelético TA de camundongos transgênicos AMPK γ 1 R70Q (AMPK ativa) e AMPK α 2 DN (AMPK inativa). ^{a,b} $p < 0,05$ vs. Controle (one-way ANOVA, pós teste Tukey); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM (n=5); ns = sem diferença estatística.

4.6. SNARK está envolvida na regulação da transcrição do *miR-696*

4.6.1. Expressão de SNARK e genes relacionados com a função mitocondrial no músculo esquelético de camundongos tratados com dieta hiperlipídica

Estudos anteriores relataram aumento na expressão de SNARK em humanos obesos (Rune et al. 2009) e em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (Lessard et al. 2016). Além disso, células C2C12 expostas à alta ou baixa dose de palmitato apresentaram aumento na expressão da proteína SNARK (Lessard et al. 2016). Consistente com estes resultados, observamos que camundongos tratados com DHL por 12 semanas apresentaram aumento na expressão de SNARK (Figuras 23) e redução de genes envolvidos na função e biogênese mitocondrial em relação ao grupo controle (Figura 24).

Figura 23. Expressão relativa de SNARK em camundongos submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica

Expressão relativa de SNARK relativa ao gene constitutivo GAPDH, respectivamente, foi mensurada em músculo esquelético TA de camundongos C57BL/6 tratados com DHL ou dieta padrão durante 12 semanas. Estatística, * $p < 0,05$ vs. Controle (*t-test*); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM ($n = 5$ por grupo).

Figura 24. Expressão relativa dos genes relacionados com a função mitocondrial em camundongos submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica

Expressão relativa dos genes *PGC-1 α* , *PGC-1 β* , *TFAM*, *NRF1*, *NRF2*, *Ppar- γ* , *Glut4* e *Glut1* relativos ao gene constitutivo *RPL39*, respectivamente, foi mensurada em músculo esquelético TA de camundongos C57BL/6 tratados com DHL ou dieta padrão durante 12 semanas. Estatística, * $p < 0,05$ vs. Controle (*t-test*); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM (n = 5 por grupo).

4.6.2. Efeito do silenciamento da proteína SNARK na função mitocondrial de células C2C12

De acordo com os resultados anteriores, decidimos investigar se tanto a expressão do *miR-696* como do PGC-1 α são reguladas por um mecanismo dependente de SNARK. Sendo assim, transfectamos células C2C12 com o siRNA contra SNARK (siSNARK) no intuito de observar os efeitos causados pela redução na expressão desta proteína. Foi possível constatar que a expressão de SNARK reduziu significativamente os níveis de mRNA (~75%) e proteína (60%) (Figura 25 A e B) em comparação com células transfectadas com a sequência do siRNA contra SNARK embaralhada (*Scramble*). Ainda, observamos aumento na expressão de genes relacionados à função mitocondrial e ao transporte de glicose, 48 horas após a transfecção de células C2C12 com siSNARK. Curiosamente, a expressão de PGC-1 α manteve-se inalterada pela redução na expressão de SNARK (Figura 26). Associado a este efeito, as células transfectadas com siSNARK apresentaram aumento no consumo de oxigênio nos estados basal e máximo (Figura 27 A e B).

Figura 25. Efeito do silenciamento de SNARK sobre os níveis de mRNA e de proteína

(A) Expressão relativa dos genes *SNARK* e *miR-696*, relativos ao constitutivo *GAPDH* e *SnoR-202*, respectivamente. (B) *Western Blot* de SNARK total e fosforilada, no resíduo Treonina-208. A e B foram realizados em células musculares C2C12 transfectadas com o siRNA contra SNARK (siSNARK). As células controles foram transfectadas com a sequência siSNARK embaralhada (*Scramble*). GAPDH foi usada como controle interno. Estatística, * $p < 0,05$ vs. Controle (*t-test*); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM ($n = 3$).

Figura 26. Efeito do silenciamento de SNARK sobre a transcrição de genes relacionados com a função e biogênese mitocondrial

Expressão relativa dos genes *PGC-1 α* , *Tfam*, *Nrf1*, *Nrf2*, *GLUT4*, *GLUT1*, *SIRT1*, *UCP2*, *CS*, *COXII*, *ATPSynt*, *PDK4* e *CytoC*, relativos ao constitutivo *GAPDH* foi avaliada em células musculares C2C12 transfectadas com o siRNA contra SNARK (siSNARK). As células controles foram transfectadas com a sequência siSNARK embaralhada (*Scramble*). Estatística, * $p < 0,05$ vs. Controle (*t-test*); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM ($n = 6$).

Figura 27. Efeito do silenciamento de SNARK no consumo de oxigênio

Taxa de consumo de oxigênio nos estados basal, na presença de oligomicina (1 $\mu\text{g/mL}$) e máximo, na presença de FCCP (1 μM) em células musculares C2C12 transfetadas com o siRNA contra SNARK (siSNARK). As células controles foram transfetadas com a sequência siSNARK embaralhada (*Scramble*). (B) Os dados de consumo foram ilustrados de acordo com a subtração dos momentos Basal, Oligomicina e FCCP menos os valores durante o consumo com rotenona (Basal – Rotenona = Basal; Oligomicina – Rotenona = Desacoplada; FCCP – Rotenona = Máxima). Estatística, * $p < 0,05$ vs. Controle (*t-test*); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM ($n = 5$).

4.6.3. Efeito da superexpressão de SNARK na função mitocondrial

Paralelamente, transfectamos células C2C12 na fase de mioblastos com plasmídeos contendo a sequência que dá origem a proteína SNARK em humanos (SNARK), a qual possui 85% de similaridade com seu ortólogo em camundongos. Como resultado, observamos aumento na fosforilação de SNARK (Figura 28A) em comparação com células C2C12 transfectadas com vetor vazio (EV). Além de redução na expressão de *PGC-1 α* e aumento na expressão do *miR-696* (Figura 28B). Ainda, observamos aumento na expressão de genes relacionados à função mitocondrial (Figura 29). Essas alterações foram seguidas pela redução no consumo de oxigênio somente no estado basal (Figura 30).

Figura 28. Efeito da superexpressão de SNARK nos próprios níveis de RNA e proteína

(A) *Western Blot* de SNARK total e fosforilada, no resíduo Treonina-208; GAPDH foi usada como controle interno. (B) Expressão relativa dos genes *PGC-1 α* e *miR-696*, relativos ao constitutivo *GAPDH* e *SnoR-202*, respectivamente, foram realizados em células musculares C2C12 transfectadas com o vetor de superexpressão de SNARK (SNARK) ou com GFP (Controle). Estatística, * $p < 0,05$ vs. Controle (*t-test*); (n = 6).

Figura 29. Efeito da superexpressão de SNARK no consumo de oxigênio

Taxa no consumo de oxigênio nos estados basal, mínimo, na presença de oligomicina (1 $\mu\text{g/mL}$), e máximo, na presença de FCCP (1 μM) em células musculares C2C12 transfectadas com o siRNA contra SNARK (siSNARK). As células controles foram transfectadas com o vetor de superexpressão de SNARK (SNARK) ou com GFP (Controle). (B) Os dados de consumo foram ilustrados de acordo com a subtração dos momentos Basal, Oligomicina e FCCP menos os valores durante o consumo com rotenona (Basal – Rotenona = Basal; Oligomicina – Rotenona = Desacoplada; FCCP – Rotenona = Máxima). Estatística, * $p < 0,05$ vs. Controle (t -test); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM ($n = 5$).

4.6.4. Expressão de PGC-1 α e *miR-696* em músculo esquelético de camundongos com superexpressão ou inativação de SNARK

Após resultados favoráveis à nossa hipótese, na qual afirmamos que a proteína SNARK poderia estar envolvida na regulação da transcrição do *miR-696*. Utilizamos duas linhagens de camundongos transgênicos para SNARK, especificamente no músculo esquelético. A primeira linhagem foi determinada por camundongos contendo uma mutação no aminoácido treonina na posição 208 que corresponde ao domínio quinase de fosforilação, por uma alanina no intuito de inibir a fosforilação desta proteína e, conseqüentemente, prejudicar sua sinalização (SNARK DN). Já a segunda linhagem foi desenvolvida com objetivo de superexpressar a proteína SNARK, bem como favorecer sua atividade (SNARK SWT). Os resultados obtidos a partir destes animais transgênicos mostraram que a expressão de PGC-1 α ou *miR-696* não foram alteradas nos camundongos com SNARK inativa (SNARK DN). Entretanto, camundongos superexpressando o gene ortólogo para SNARK de humanos (SNARK SWT) apresentaram redução na transcrição de PGC-1 α e aumento na expressão do *miR-696* (Figura 29). Estes achados sugerem que a proteína SNARK pode estar envolvida no controle da transcrição do microRNA *miR-696* e do PGC-1 α , bem como na função mitocondrial como mediadora do sinal retrógrado mitocondrial no tecido muscular esquelético.

Figura 30. Expressão relativa dos genes *miR-696* e *PGC-1α* em camundongos transgênicos para SNARK

Expressão relativa dos genes *PGC-1α* e *miR-696*, relativos aos genes constitutivos *GAPDH* e *SnoR-202*, respectivamente, foi mensurada em músculo esquelético TA de camundongos transgênicos SNARK DN e SNARK WT. ^{a,b} $p < 0,05$ vs. Controle (one-way ANOVA, pós teste Tukey); as barras foram representadas por média $\pm$ EPM (n=5).

Discussão

5. Discussão

Neste estudo, demonstramos que o estresse metabólico associado à função mitocondrial induz a expressão do microRNA *miR-696*, que por sua vez, reduz a expressão de PGC-1 α prejudicando a função mitocondrial em células musculares esqueléticas. Curiosamente, a proteína quinase AMPK não exerce controle sobre os processos de transcrição do *miR-696*, contudo SNARK, uma quinase relacionada a AMPK, apresenta um papel significativo no controle da expressão do *miR-696* e na função mitocondrial.

Ao longo da última década, tem sido demonstrado que um número crescente de miRs estão envolvidos no desenvolvimento e complicações da diabetes e parecem desempenhar um papel central regulando vários processos biológicos, como a biogênese e função mitocondrial (Mohamed et al. 2014; Massart et al. 2016). Os miRs *miR-485-3p* e *miR-485-5p* reduziram a respiração mitocondrial, a migração celular e a invasão do câncer da mama (Lou et al. 2016); os miRs *miR-19b/221/222* induziram a disfunção das células endoteliais na progressão da aterosclerose (Xue et al. 2015); o *miR-23* induziu o remodelamento concêntrico e a disfunção mitocondrial no coração (Sun et al. 2014) e o *miR-761* prejudicou a biogênese mitocondrial e foi reduzido em resposta ao exercício físico (Xu et al. 2015). A proteína PGC-1 α tem sido considerada um dos principais fatores nucleares envolvidos no processo de biogênese mitocondrial e sua expressão apresenta-se reduzida em indivíduos com diabetes (Patti et al. 2003; Crunkhorn et al. 2007; Mootha et al. 2003).

PGC-1 α pode ser regulada através de modificações pós-traducionais tais como acetilação (Nemoto et al. 2005) e fosforilação (Jäger et al. 2007), enquanto que, pós-transcricionalmente esta regulação pode ser realizada através de miRs. A região 3'UTR de PGC-1 α é compreendida de uma longa sequência de 3801 pb e, até o presente momento, poucos miRNAs foram relatados por regular, diretamente, a expressão de PGC-1 α . No intuito de esclarecer quais os miRs seriam os mais prováveis candidatos a interagir com o mRNA de PGC-1 α , examinamos a região 3'UTR de PGC-1 α através da utilização do banco de dados *STarMirDB*, o qual integra dados de interação entre miRNA-RNA. A análise feita apontou para o microRNA *miR-696* como um possível alvo relacionado com a disfunção mitocondrial no músculo esquelético

durante o diabetes. Sendo assim, apresentamos evidências da regulação direta de PGC-1 α através do *miR-696* como foi demonstrado por meio de um ensaio repórter no qual a redução no sinal de fluorescência de GFP representou a interação entre o *miR-696* e a sequência 3'UTR de PGC-1 α fusionada a GFP.

Um estudo prévio observou que a expressão do *miR-696* regula a expressão de PGC-1 α em músculo esquelético de camundongos em resposta ao exercício e a imobilização (Aoi et al. 2010). Com objetivo de confirmar essa relação entre PGC-1 α e *miR-696*, realizamos uma série de experimentos em condições nas quais a expressão de PGC-1 α estivesse alterada. Estudos anteriores relataram que, tanto os níveis de proteínas como de mRNA de PGC-1 α é mais abundante em fibras do músculo esquelético com características mais oxidativas (tipo I) do que em fibras com características mais glicolíticas (tipo II). Além disso, a superexpressão de PGC-1 α em cultura de células musculares foi responsável pela conversão de fibras do tipo II para fibras do tipo I (Rasbach et al. 2010; Schuler et al. 2006; Lin et al. 2002). Neste sentido, nossos resultados mostraram que a expressão do *miR-696* estava maior no músculo esquelético TA (predominantemente composto por fibras do tipo II) do que no músculo esquelético *soleus* (predominantemente composto por fibras do tipo I). A expressão do *miR-696* representa, em parte, um dos fatores responsáveis pela diferença na expressão de PGC-1 α em tecidos do músculo esquelético com diferentes características metabólicas.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram dados pré-existent na literatura, onde modelos de indução ao diabetes, como o composto estreptozotocina, o qual causa a morte das células β -pancreáticas, e a dieta hiperlipídica, o qual causa obesidade, apresentaram redução na expressão de PGC-1 α no músculo esquelético de camundongos (Patti et al. 2003; Franko et al. 2012; Whitman et al. 2013; Rocha-Rodrigues et al. 2016). Em contraste, notamos o aumento na expressão do *miR-696* no músculo esquelético TA destes camundongos. O mesmo efeito foi observado em células C2C12 expostas a alta concentração de palmitato, as quais também apresentaram redução na expressão de PGC-1 α . Além disso, a transfecção transiente com o mimético do *miR-696*, em células C2C12, induziu a redução na expressão de PGC-1 α e na respiração basal. É importante destacar que a transfecção com o antagomiR do *miR-696* preveniu, em parte, os efeitos provocados pela

sobrecarga de palmitato nessas células tais como a redução no consumo de oxigênio, o aumento da produção de ROS e a diminuição de alguns genes relacionados à biogênese mitocondrial. Esse resultados indicam o envolvimento do *miR-696* na regulação da função mitocondrial dependente de PGC-1 α .

A sinalização estimulada por alterações na atividade mitocondrial pode levar à intercomunicação entre a mitocôndria e outras organela presentes nas células, a qual foi denominada como sinal retrógrado mitocondrial (Kleine and Leister 2013; Liu and Butow 2006). Por exemplo, a produção de ROS, em consequência de um mal funcionamento na cadeia transportadora de elétrons, pode resultar no processo de dano no DNA nuclear, o qual causa desequilíbrio na expressão de genes envolvidos na função mitocondrial (Velez et al. 2011; Zhao et al. 2016). Após verificação da interação existente entre *miR-696* e PGC-1 α , propomos analisar qual mecanismo responsável por elevar a transcrição do *miR-696* em condições de aumento do estresse metabólico, como o diabetes induzido por STZ ou HFD e células C2C12 expostas ao palmitato. Estudos demonstraram que nestes modelos, o aumento na expressão do *miR-696* reduziu a síntese de ATP (Moritz et al. 2012; Szkudelski 2012; Laurent et al. 2007). Além disso, pacientes com diabetes tipo 1 ou tipo 2, também exibem níveis mais baixos de ATP em comparação com indivíduos saudáveis (Stump et al. 2003; Karakelides et al. 2007). Reduções nos níveis de ATP são sempre acompanhadas por aumentos ainda maiores na razão AMP/ATP e afetam a sinalização celular, em parte, através de proteínas quinases, uma classe de proteínas que sinaliza através de processos de fosforilação e são cruciais para a manutenção de vários processos celulares metabólicos (Hardie 2014).

Por exemplo, AMPK, uma proteína com papel relevante no aspecto do estado energético celular, foi negativamente correlacionada com a diabetes (Ruderman et al. 2013), descrita como um mediador para a sinalização retrógrada da mitocôndria para o núcleo (Friis et al. 2014; Ho et al. 2013) e foi relatada por fosforilar, diretamente, PGC -1 α nos resíduos de treonina-177 e serina-538(Jäger et al. 2007). Contudo, os nossos dados mostraram que o composto AICAR, um ativador bem conhecido desta quinase não teve qualquer influência sobre a expressão do *miR-696*. Também não foi possível observar

qualquer efeito da AMPK sobre a expressão de *miR-696* no músculo de camundongos que superexpressam AMPK com a subunidade $\gamma 3$ com uma mutação (R70Q) ativadora ou AMPK com a subunidade $\alpha 2$ com uma mutação dominante-negativa (D157A).

Recentemente, a proteína SNARK, uma quinase relacionada com AMPK, tem sido associada a alguns processos celulares como o transporte de glicose durante a contração dos músculos esqueléticos (Koh et al. 2010), a obesidade (Rune et al. 2009), a regulação da massa muscular e sobrevivência celular (Lessard et al. 2016) e a inibição da apoptose contribuindo para a promoção da atividade tumoral (Legembre et al. 2004). Cultura de células musculares de indivíduos diabéticos expostas ao tratamento com palmitato ou TNF α apresentaram aumento na expressão de SNARK (Rune et al. 2009). Interessantemente, um estudo recente observou o mesmo aumento em camundongos submetidos cronicamente a dieta hiperlipídica, além de notar um aumento gradual na expressão de SNARK durante a diferenciação de células C2C12 (Lessard et al. 2016). De maneira complementar, outro estudo demonstrou redução gradual na expressão de PGC-1 α em células C2C12 ao longo de sua diferenciação (Adamovich et al. 2013). Além disso, de acordo com nossos resultados, observamos que a expressão do *miR-696* durante a diferenciação de células C2C12 segue padrão similar ao observado na expressão de SNARK nas mesmas condições. Juntando estes dados ao nossos de expressão do *miR-696*, hipotetizamos que SNARK poderia estar envolvida no SRM mediando o sinal retrógrado secundário entre a mitocôndria e o núcleo celulares, e ativando a transcrição do *miR-696* com consequente inibição de PGC-1 α . Observamos que a redução de SNARK através da transfecção com siSNARK, em células C2C12, diminuiu a expressão do *miR-696* e aumentou a taxa de consumo de oxigênio, sem alterar a expressão do mRNA de PGC-1 α . A mutação induzindo a redução na atividade quinase de SNARK em camundongos foi responsável por diminuir a área de secção transversa das fibras glicolíticas, bem como o aumento da massa gorda (Lessard et al. 2016). Interessantemente, camundongos transgênicos superexpressando PGC-1 α no músculo esquelético apresentaram redução na captação de glicose marcada, foram mais propensos a resistência à insulina induzida por HFD e apresentaram aumento do conteúdo de triglicerídeos e

diacilgliceróis intracelulares (Choi et al. 2008). Além disso, camundongos nocautes heterozigotos para SNARK apresentaram redução no transporte de glicose induzido pela contração muscular (Koh et al. 2010).

Devemos ressaltar que SNARK possui um gene homólogo, NUA1, com 58% de similaridade em toda a sua sequência e 82% de no domínio quinase. A ablação do gene NUA1 especificamente no músculo esquelético de camundongos foi capaz de tornar estes animais resistentes ao processo de intolerância à glicose induzido por dieta hiperlipídica (Inazuka et al. 2012). Tal efeito poderia estar associado ao aumento de PGC-1 α , o qual foi descrito por restabelecer a expressão de GLUT4 em células musculares e aumentar a captação de glicose em decorrência do aumento na função mitocondrial (Oliveira et al. 2004; Michael et al. 2001).

Interessantemente, camundongos nocautes de LKB1, uma serina/treonina capaz de ativar a cascata de sinalização de AMPK, apresentaram redução significativa na atividade de SNARK e na captação de glicose induzida por contração muscular. Entretanto, não foram observadas alterações quanto a captação de glicose estimulada por insulina nestes animais (Koh et al. 2010). Em contraste, a superexpressão de SNARK, em células C2C12, bem como em camundongos, foi responsável pelo aumento da transcrição do *miR-696*, um efeito que foi consistente com a redução na expressão de PGC-1 α e no consumo de oxigênio. Estes resultados nos levam a propor que SNARK parece exercer um papel importante na regulação da captação de glicose, exclusivamente, induzida pela contração muscular, sendo este efeito independente de PGC-1 α . Entretanto em condições basais, SNARK parece exercer controle na transcrição do *miR-696* e alterar a função mitocondrial em um mecanismo dependente de PGC-1 α . Sugerimos que SNARK modular a transcrição de genes independentemente de sua atividade quinase, o que poderia explicar o papel ambíguo de SNARK no controle da expressão de PGC-1 α .

Conclusão

6. Conclusão

Nossos achados mostram que o estresse metabólico, evidenciado pelo tratamento com HFD, estreptozotocina ou palmitato, induz aumento na expressão do *miR-696*. Nessas condições, observamos inibição da sinalização do PGC-1 α , um efeito que foi consistente com a redução da função mitocondrial e, conseqüentemente, menor resposta à insulina no músculo esquelético. Ainda, a atividade aumentada de SNARK, um sensor do estresse metabólico, exerce controle sobre a expressão do *miR-696* no músculo esquelético. Investigações futuras sobre o controle molecular da via SNARK-*miR-696*-PGC-1 α podem contribuir com novas perspectivas terapêuticas contra doenças metabólicas, incluindo o diabetes tipo 2. Sendo assim, abrindo caminho para novos estudos relacionados à transcrição de microRNAs em resposta ao sinal retrógrado mitocondrial.

Figura 31. Mecanismo proposto para a indução da disfunção mitocondrial pelo *miR-696*

O estresse metabólico gerado em condições de inatividade, por intermédio de proteínas inflamatórias ou através de dieta hiperlipídica ocasiona severas alterações no funcionamento mitocondrial, tais como a redução na síntese de ATP e no fluxo do ciclo do ácido cítrico (CAT), bem como o aumento na geração de espécies reativas de oxigênio. Nessa condição, um sinal primário retrógrado iniciado na mitocôndria é transmitido para o núcleo através da proteína quinase SNARK que induz a transcrição do microRNA *miR-696*. O aumento na expressão do *miR-696* inicia um sinal anterógrado para a mitocôndria, o qual resulta na inibição de PGC-1α pelo *miR-696* e, consequentemente, sua atividade sobre a biogênese e função mitocondrial.

Referências

7. Referências

- Abbatecola, A.M., Paolisso, G., Fattoretti, P., Evans, W.J., Fiore, V., Dicioccio, L. and Lattanzio, F. 2011. Discovering pathways of sarcopenia in older adults: a role for insulin resistance on mitochondria dysfunction. *J Nutr Health Aging* 15(10), pp. 890–895.
- Adamovich, Y., Shlomai, A., Tsvetkov, P., Umansky, K.B., Reuven, N., Estall, J.L., Spiegelman, B.M. and Shaul, Y. 2013. The protein level of PGC-1 α , a key metabolic regulator, is controlled by NADH-NQO1. *Mol Cell Biol* 33(13), pp. 2603–2613.
- Anderson, E.J., Lustig, M.E., Boyle, K.E., Woodlief, T.L., Kane, D.A., Lin, C.-T., Price, J.W., Kang, L., Rabinovitch, P.S., Szeto, H.H., Houmard, J.A., Cortright, R.N., Wasserman, D.H. and Neuffer, P.D. 2009. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest* 119(3), pp. 573–581.
- Andres, A.M., Stotland, A., Queliconi, B.B. and Gottlieb, R.A. 2015. A time to reap, a time to sow: mitophagy and biogenesis in cardiac pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol* 78, pp. 62–72.
- Aoi, W., Naito, Y., Mizushima, K., Takanami, Y., Kawai, Y., Ichikawa, H. and Yoshikawa, T. 2010. The microRNA *miR-696* regulates PGC-1 α in mouse skeletal muscle in response to physical activity. *American journal of physiology*.
- Aoi, W., Naito, Y. and Yoshikawa, T. 2013. Role of oxidative stress in impaired insulin signaling associated with exercise-induced muscle damage. *Free Radic Biol Med* 65, pp. 1265–1272.
- Arany, Z. 2008. PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease. *Curr Opin Genet Dev* 18(5), pp. 426–434.
- Ashwell, G. 1964. CARBOHYDRATE METABOLISM. *Annu Rev Biochem* 33, pp. 101–138.
- Barbosa, M.R., Sampaio, I.H., Teodoro, B.G., Sousa, T.A., Zoppi, C.C., Queiroz, A.L., Passos, M.A., Alberici, L.C., Teixeira, F.R., Manfiolli, A.O., Batista, T.M., Cappelli, A.P.G., Reis, R.I., Frasson, D., Kettelhut, I.C., Parreiras-e-Silva, L.T., Costa-Neto, C.M., Carneiro, E.M., Curi, R. and Silveira, L.R. 2013. Hydrogen peroxide production regulates the mitochondrial function in insulin resistant muscle cells: effect of catalase overexpression. *Biochim Biophys Acta* 1832(10), pp. 1591–1604.
- Barré, L., Richardson, C., Hirshman, M.F., Brozinick, J., Fiering, S., Kemp, B.E., Goodyear, L.J. and Witters, L.A. 2007. Genetic model for the chronic activation of skeletal muscle AMP-activated protein kinase leads to glycogen accumulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(3), pp. E802–11.
- Biggar, K.K. and Storey, K.B. 2015. Insight into post-transcriptional gene regulation: stress-responsive microRNAs and their role in the environmental stress survival of tolerant animals. *J Exp Biol* 218(Pt 9), pp. 1281–1289.
- Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M.P., Korde, A., Ye, L., Lo, J.C., Rasbach, K.A., Boström, E.A., Choi, J.H., Long, J.Z., Kajimura, S., Zingaretti, M.C., Vind, B.F., Tu, H., Cinti, S., Højlund, K., Gygi, S.P. and Spiegelman, B.M. 2012. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 481(7382), pp. 463–468.
- Broughton, J.P., Lovci, M.T., Huang, J.L., Yeo, G.W. and Pasquinelli, A.E. 2016. Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol Cell* 64(2), pp. 320–333.

Burkart, A.M., Tan, K., Warren, L., Iovino, S., Hughes, K.J., Kahn, C.R. and Patti, M.-E. 2016. Insulin Resistance in Human iPS Cells Reduces Mitochondrial Size and Function. *Sci Rep* 6, p. 22788.

Caputto, R., Barra, H.S. and Cumar, F.A. 1967. Carbohydrate metabolism. *Annu Rev Biochem* 36, pp. 211–246.

Carvalho-Filho, M.A., Ropelle, E.R., Pauli, R.J., Cintra, D.E., Tsukumo, D.M.L., Silveira, L.R., Curi, R., Carvalheira, J.B.C., Velloso, L.A. and Saad, M.J.A. 2009. Aspirin attenuates insulin resistance in muscle of diet-induced obese rats by inhibiting inducible nitric oxide synthase production and S-nitrosylation of IRbeta/IRS-1 and Akt. *Diabetologia* 52(11), pp. 2425–2434.

Chae, S., Ahn, B.Y., Byun, K., Cho, Y.M., Yu, M.-H., Lee, B., Hwang, D. and Park, K.S. 2013. A systems approach for decoding mitochondrial retrograde signaling pathways. *Sci Signal* 6(264), p. rs4.

Chinsomboon, J., Ruas, J., Gupta, R.K., Thom, R., Shoag, J., Rowe, G.C., Sawada, N., Raghuram, S. and Arany, Z. 2009. The transcriptional coactivator PGC-1alpha mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(50), pp. 21401–21406.

Choi, C.S., Befroy, D.E., Codella, R., Kim, S., Reznick, R.M., Hwang, Y.-J., Liu, Z.-X., Lee, H.-Y., Distefano, A., Samuel, V.T., Zhang, D., Cline, G.W., Handschin, C., Lin, J., Petersen, K.F., Spiegelman, B.M. and Shulman, G.I. 2008. Paradoxical effects of increased expression of PGC-1alpha on muscle mitochondrial function and insulin-stimulated muscle glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(50), pp. 19926–19931.

Choi, C.S., Savage, D.B., Abu-Elheiga, L., Liu, Z.-X., Kim, S., Kulkarni, A., Distefano, A., Hwang, Y.-J., Reznick, R.M., Codella, R., Zhang, D., Cline, G.W., Wakil, S.J. and Shulman, G.I. 2007. Continuous fat oxidation in acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(42), pp. 16480–16485.

Coen, P.M., Menshikova, E.V., Distefano, G., Zheng, D., Tanner, C.J., Standley, R.A., Helbling, N.L., Dubis, G.S., Ritov, V.B., Xie, H., Desimone, M.E., Smith, S.R., Stefanovic-Racic, M., Toledo, F.G.S., Houmard, J.A. and Goodpaster, B.H. 2015. Exercise and Weight Loss Improve Muscle Mitochondrial Respiration, Lipid Partitioning, and Insulin Sensitivity After Gastric Bypass Surgery. *Diabetes* 64(11), pp. 3737–3700.

Crunkhorn, S., Dearie, F., Mantzoros, C., Gami, H., da Silva, W.S., Espinoza, D., Faucette, R., Barry, K., Bianco, A.C. and Patti, M.E. 2007. Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1 expression is reduced in obesity: potential pathogenic role of saturated fatty acids and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 282(21), pp. 15439–15450.

DeFronzo, R.A. and Tripathy, D. 2009. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32 Suppl 2, pp. S157–63.

Ding, H., Heng, B., He, W., Shi, L., Lai, C., Xiao, L., Ren, H., Mo, S. and Su, Z. 2016. Chronic reactive oxygen species exposure inhibits glucose uptake and causes insulin resistance in C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun* 478(2), pp. 798–803.

Ding, Y., Chan, C.Y. and Lawrence, C.E. 2004. Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 32(Web Server issue), pp. W135–41.

Ding, Y. and Lawrence, C.E. 2003. A statistical sampling algorithm for RNA secondary structure prediction. *Nucleic Acids Res* 31(24), pp. 7280–7301.

- Ding, Y. and Lawrence, C.E. 2001. Statistical prediction of single-stranded regions in RNA secondary structure and application to predicting effective antisense target sites and beyond. *Nucleic Acids Res* 29(5), pp. 1034–1046.
- Dugan, L.L., You, Y.-H., Ali, S.S., Diamond-Stanic, M., Miyamoto, S., DeClevés, A.-E., Andreyev, A., Quach, T., Ly, S., Shekhtman, G., Nguyen, W., Chepetan, A., Le, T.P., Wang, L., Xu, M., Paik, K.P., Fogo, A., Viollet, B., Murphy, A., Brosius, F. and Sharma, K. 2013. AMPK dysregulation promotes diabetes-related reduction of superoxide and mitochondrial function. *J Clin Invest* 123(11), pp. 4888–4899.
- El-Hattab, A.W. and Scaglia, F. 2016. Mitochondrial cytopathies. *Cell Calcium*.
- Esteves, P., Pecqueur, C., Ransy, C., Esnous, C., Lenoir, V., Bouillaud, F., Bulteau, A.-L., Lombès, A., Prip-Buus, C., Ricquier, D. and Alves-Guerra, M.-C. 2014. Mitochondrial retrograde signaling mediated by UCP2 inhibits cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Cancer Res* 74(14), pp. 3971–3982.
- Feng, J., Xing, W. and Xie, L. 2016. Regulatory Roles of MicroRNAs in Diabetes. *Int J Mol Sci* 17(10).
- Franko, A., von Kleist-Retzow, J.C., Böse, M., Sanchez-Lasheras, C., Brodesser, S., Krut, O., Kunz, W.S., Wiedermann, D., Hoehn, M., Stöhr, O., Moll, L., Freude, S., Krone, W., Schubert, M. and Wiesner, R.J. 2012. Complete failure of insulin-transmitted signaling, but not obesity-induced insulin resistance, impairs respiratory chain function in muscle. *J Mol Med* 90(10), pp. 1145–1160.
- Friis, R.M.N., Graves, J.P., Huan, T., Li, L., Sykes, B.D. and Schultz, M.C. 2014. Rewiring AMPK and mitochondrial retrograde signaling for metabolic control of aging and histone acetylation in respiratory-defective cells. *Cell Rep* 7(2), pp. 565–574.
- Fujii, N., Hirshman, M.F., Kane, E.M., Ho, R.C., Peter, L.E., Seifert, M.M. and Goodyear, L.J. 2005. AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ activity is not essential for contraction- and hyperosmolarity-induced glucose transport in skeletal muscle. *J Biol Chem* 280(47), pp. 39033–39041.
- Gläßer, C., Haberer, G., Finkemeier, I., Pfannschmidt, T., Kleine, T., Leister, D., Dietz, K.-J., Häusler, R.E., Grimm, B. and Mayer, K.F.X. 2014. Meta-analysis of retrograde signaling in *Arabidopsis thaliana* reveals a core module of genes embedded in complex cellular signaling networks. *Mol Plant* 7(7), pp. 1167–1190.
- Greene, N.P., Lee, D.E., Brown, J.L., Rosa, M.E., Brown, L.A., Perry, R.A., Henry, J.N. and Washington, T.A. 2015. Mitochondrial quality control, promoted by PGC-1 α , is dysregulated by Western diet-induced obesity and partially restored by moderate physical activity in mice. *Physiol Rep* 3(7).
- Handschin, C., Choi, C.S., Chin, S., Kim, S., Kawamori, D., Kurpad, A.J., Neubauer, N., Hu, J., Mootha, V.K., Kim, Y.-B., Kulkarni, R.N., Shulman, G.I. and Spiegelman, B.M. 2007. Abnormal glucose homeostasis in skeletal muscle-specific PGC-1 α knockout mice reveals skeletal muscle-pancreatic beta cell crosstalk. *J Clin Invest* 117(11), pp. 3463–3474.
- Hanssen, M.J.W., Hoeks, J., Brans, B., van der Lans, A.A.J.J., Schaart, G., van den Driessche, J.J., Jörgensen, J.A., Boekschoten, M.V., Hesselink, M.K.C., Havekes, B., Kersten, S., Mottaghy, F.M., van Marken Lichtenbelt, W.D. and Schrauwen, P. 2015. Short-term cold acclimation improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nat Med* 21(8), pp. 863–865.
- Hao, Y., Liu, J.R., Zhang, Y., Yang, P.G., Feng, Y.J., Cui, Y.J., Yang, C.H. and Gu, X.H. 2016. The microRNA expression profile in porcine skeletal muscle is changed by constant heat stress. *Anim Genet* 47(3), pp. 365–369.

- Hardie, D.G. 2014. AMPK--sensing energy while talking to other signaling pathways. *Cell Metab* 20(6), pp. 939–952.
- Hartl, M. and Finkemeier, I. 2012. Plant mitochondrial retrograde signaling: post-translational modifications enter the stage. *Front Plant Sci* 3, p. 253.
- Hatazawa, Y., Senoo, N., Tadaishi, M., Ogawa, Y., Ezaki, O., Kamei, Y. and Miura, S. 2015. Metabolomic Analysis of the Skeletal Muscle of Mice Overexpressing PGC-1 α . *PLoS ONE* 10(6), p. e0129084.
- Hayashida, S., Arimoto, A., Kuramoto, Y., Kozako, T., Honda, S.-I., Shimeno, H. and Soeda, S. 2010. Fasting promotes the expression of SIRT1, an NAD⁺-dependent protein deacetylase, via activation of PPAR α in mice. *Mol Cell Biochem* 339(1-2), pp. 285–292.
- He, J., Thamotharan, M. and Devaskar, S.U. 2003. Insulin-induced translocation of facilitative glucose transporters in fetal/neonatal rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284(4), pp. R1138–46.
- Herzig, S., Long, F., Jhala, U.S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., Spiegelman, B. and Montminy, M. 2001. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413(6852), pp. 179–183.
- Hilder, T.L., Baer, L.A., Fuller, P.M., Fuller, C.A., Grindeland, R.E., Wade, C.E. and Graves, L.M. 2005. Insulin-independent pathways mediating glucose uptake in hindlimb-suspended skeletal muscle. *J Appl Physiol* 99(6), pp. 2181–2188.
- Hirabara, S.M., Silveira, L.R., Abdulkader, F., Carvalho, C.R.O., Procopio, J. and Curi, R. 2007. Time-dependent effects of fatty acids on skeletal muscle metabolism. *J Cell Physiol* 210(1), pp. 7–15.
- Hoehn, K.L., Turner, N., Swarbrick, M.M., Wilks, D., Preston, E., Phua, Y., Joshi, H., Furler, S.M., Larance, M., Hegarty, B.D., Leslie, S.J., Pickford, R., Hoy, A.J., Kraegen, E.W., James, D.E. and Cooney, G.J. 2010. Acute or chronic upregulation of mitochondrial fatty acid oxidation has no net effect on whole-body energy expenditure or adiposity. *Cell Metab* 11(1), pp. 70–76.
- Ho, L., Titus, A.S., Banerjee, K.K., George, S., Lin, W., Deota, S., Saha, A.K., Nakamura, K., Gut, P., Verdin, E. and Kolthur-Seetharam, U. 2013. SIRT4 regulates ATP homeostasis and mediates a retrograde signaling via AMPK. *Aging (Albany NY)* 5(11), pp. 835–849.
- Hollins, S.L. and Cairns, M.J. 2016. MicroRNA: Small RNA mediators of the brains genomic response to environmental stress. *Prog Neurobiol* 143, pp. 61–81.
- Hommelberg, P.P.H., Plat, J., Langen, R.C.J., Schols, A.M.W.J. and Mensink, R.P. 2009. Fatty acid-induced NF-kappaB activation and insulin resistance in skeletal muscle are chain length dependent. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(1), pp. E114–20.
- Huang, T., Wang-Johanning, F., Zhou, F., Kallon, H. and Wei, Y. 2016. MicroRNAs serve as a bridge between oxidative stress and gastric cancer (Review). *Int J Oncol* 49(5), pp. 1791–1800.
- Huang, Z.-P., Chen, J., Seok, H.Y., Zhang, Z., Kataoka, M., Hu, X. and Wang, D.-Z. 2013. MicroRNA-22 regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress. *Circ Res* 112(9), pp. 1234–1243.
- Inazuka, F., Sugiyama, N., Tomita, M., Abe, T., Shioi, G. and Esumi, H. 2012. Muscle-specific knock-out of NIAK family SNF1-like kinase 1 (NIAK1) prevents high fat diet-induced glucose intolerance. *J Biol Chem* 287(20), pp. 16379–16389.

- Issler, O. and Chen, A. 2015. Determining the role of microRNAs in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 16(4), pp. 201–212.
- Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J. and Spiegelman, B.M. 2007. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(29), pp. 12017–12022.
- Jentjens, R. and Jeukendrup, A. 2003. Determinants of post-exercise glycogen synthesis during short-term recovery. *Sports Med* 33(2), pp. 117–144.
- Jewell, J.L., Oh, E. and Thurmond, D.C. 2010. Exocytosis mechanisms underlying insulin release and glucose uptake: conserved roles for Munc18c and syntaxin 4. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298(3), pp. R517–31.
- Kadowaki, T., Kadowaki, H., Mori, Y., Tobe, K., Sakuta, R., Suzuki, Y., Tanabe, Y., Sakura, H., Awata, T. and Goto, Y. 1994. A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 330(14), pp. 962–968.
- Karakelides, H., Asmann, Y.W., Bigelow, M.L., Short, K.R., Dhatariya, K., Coenen-Schimke, J., Kahl, J., Mukhopadhyay, D. and Nair, K.S. 2007. Effect of insulin deprivation on muscle mitochondrial ATP production and gene transcript levels in type 1 diabetic subjects. *Diabetes* 56(11), pp. 2683–2689.
- Kim, J.-A., Wei, Y. and Sowers, J.R. 2008. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res* 102(4), pp. 401–414.
- Kleine, T. and Leister, D. 2013. Retrograde signals galore. *Front Plant Sci* 4, p. 45.
- Klip, A. 2009. The many ways to regulate glucose transporter 4. *Appl Physiol Nutr Metab* 34(3), pp. 481–487.
- Kodama, K., Toda, K., Morinaga, S., Yamada, S. and Butte, A.J. 2015. Anti-CD44 antibody treatment lowers hyperglycemia and improves insulin resistance, adipose inflammation, and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes* 64(3), pp. 867–875.
- Koh, H.-J., Toyoda, T., Fujii, N., Jung, M.M., Rathod, A., Middelbeek, R.J.-W., Lessard, S.J., Treebak, J.T., Tsuchihara, K., Esumi, H., Richter, E.A., Wojtaszewski, J.F.P., Hirshman, M.F. and Goodyear, L.J. 2010. Sucrose nonfermenting AMPK-related kinase (SNARK) mediates contraction-stimulated glucose transport in mouse skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(35), pp. 15541–15546.
- Kong, A.P.S., Xu, G., Brown, N., So, W.-Y., Ma, R.C.W. and Chan, J.C.N. 2013. Diabetes and its comorbidities--where East meets West. *Nat Rev Endocrinol* 9(9), pp. 537–547.
- Kruszka, K., Pacak, A., Swida-Barteczka, A., Nuc, P., Alaba, S., Wroblewska, Z., Karlowski, W., Jarmolowski, A. and Szweykowska-Kulinska, Z. 2014. Transcriptionally and post-transcriptionally regulated microRNAs in heat stress response in barley. *J Exp Bot* 65(20), pp. 6123–6135.
- Kuga, W., Tsuchihara, K., Ogura, T., Kanehara, S., Saito, M., Suzuki, A. and Esumi, H. 2008. Nuclear localization of SNARK; its impact on gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 377(4), pp. 1062–1066.
- Laker, R.C., Lillard, T.S., Okutsu, M., Zhang, M., Hoehn, K.L., Connelly, J.J. and Yan, Z. 2014. Exercise prevents maternal high-fat diet-induced hypermethylation of the Pgc-1 α gene and age-dependent metabolic dysfunction in the offspring. *Diabetes* 63(5), pp. 1605–1611.
- Laurent, D., Yerby, B., Deacon, R. and Gao, J. 2007. Diet-induced modulation of mitochondrial activity in rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(5), pp. E1169–77.

- Lee, C.G., Kim, J.G., Kim, H.J., Kwon, H.-K., Cho, I.J., Choi, D.W., Lee, W.H., Kim, W.D., Hwang, S.J., Choi, S. and Kim, S.G. 2014. Discovery of an integrative network of microRNAs and transcriptomics changes for acute kidney injury. *Kidney Int* 86(5), pp. 943–953.
- Lefebvre, D.L. and Rosen, C.F. 2005. Regulation of SNARK activity in response to cellular stresses. *Biochim Biophys Acta* 1724(1-2), pp. 71–85.
- Legembre, P., Schickel, R., Barnhart, B.C. and Peter, M.E. 2004. Identification of SNF1/AMP kinase-related kinase as an NF-kappaB-regulated anti-apoptotic kinase involved in CD95-induced motility and invasiveness. *J Biol Chem* 279(45), pp. 46742–46747.
- Lerin, C., Rodgers, J.T., Kalume, D.E., Kim, S., Pandey, A. and Puigserver, P. 2006. GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1alpha. *Cell Metab* 3(6), pp. 429–438.
- Lessard, S.J., Rivas, D.A., So, K., Koh, H.-J., Queiroz, A.L., Hirshman, M.F., Fielding, R.A. and Goodyear, L.J. 2016. The AMPK-related kinase SNARK regulates muscle mass and myocyte survival. *J Clin Invest* 126(2), pp. 560–570.
- Liang, H., Balas, B., Tantiwong, P., Dube, J., Goodpaster, B.H., O'Doherty, R.M., DeFronzo, R.A., Richardson, A., Musi, N. and Ward, W.F. 2009. Whole body overexpression of PGC-1alpha has opposite effects on hepatic and muscle insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(4), pp. E945–54.
- Lima, T.I., Araujo, H.N., Menezes, E.S., Sponton, C.H., Araújo, M.B., Bomfim, L.H.M., Queiroz, A.L., Passos, M.A., E Sousa, T.A., Hirabara, S.M., Martins, A.R., Sampaio, H.C.L.B., Rodrigues, A., Curi, R., Carneiro, E.M., Boschero, A.C. and Silveira, L.R. 2016. Role of microRNAs on the Regulation of Mitochondrial Biogenesis and Insulin Signaling in Skeletal Muscle. *J Cell Physiol*.
- Lim, J.H., Lee, J.I., Suh, Y.H., Kim, W., Song, J.H. and Jung, M.H. 2006. Mitochondrial dysfunction induces aberrant insulin signalling and glucose utilisation in murine C2C12 myotube cells. *Diabetologia* 49(8), pp. 1924–1936.
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.-Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., Lowell, B.B., Bassel-Duby, R. and Spiegelman, B.M. 2002. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418(6899), pp. 797–801.
- Liu, Z. and Butow, R.A. 2006. Mitochondrial retrograde signaling. *Annu Rev Genet* 40, pp. 159–185.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4), pp. 402–408.
- Lou, C., Xiao, M., Cheng, S., Lu, X., Jia, S., Ren, Y. and Li, Z. 2016. MiR-485-3p and miR-485-5p suppress breast cancer cell metastasis by inhibiting PGC-1α expression. *Cell Death Dis* 7, p. e2159.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R. and Golub, T.R. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435(7043), pp. 834–838.
- Lu, W., Yan, X., Huang, Q., Hu, Y., Zhong, M., Huang, Z., Chen, H. and Cheng, H. 2008. [Study of the 482G/A variation in PGC-1alpha gene domain MEF2C as possible mechanism of type 2 diabetes]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 25(6), pp. 616–623.

- Mallappa, C., Nasipak, B.T., Etheridge, L., Androphy, E.J., Jones, S.N., Sagerström, C.G., Ohkawa, Y. and Imbalzano, A.N. 2010. Myogenic microRNA expression requires ATP-dependent chromatin remodeling enzyme function. *Mol Cell Biol* 30(13), pp. 3176–3186.
- Martínez-Redondo, V., Pettersson, A.T. and Ruas, J.L. 2015. The hitchhiker's guide to PGC-1 α isoform structure and biological functions. *Diabetologia* 58(9), pp. 1969–1977.
- Massart, J., Katayama, M. and Krook, A. 2016. microManaging glucose and lipid metabolism in skeletal muscle: Role of microRNAs. *Biochim Biophys Acta*.
- Mathai, A.S., Bonen, A., Benton, C.R., Robinson, D.L. and Graham, T.E. 2008. Rapid exercise-induced changes in PGC-1 α mRNA and protein in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 105(4), pp. 1098–1105.
- McGee, S.L., van Denderen, B.J.W., Howlett, K.F., Mollica, J., Schertzer, J.D., Kemp, B.E. and Hargreaves, M. 2008. AMP-activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5. *Diabetes* 57(4), pp. 860–867.
- Michael, L.F., Wu, Z., Cheatham, R.B., Puigserver, P., Adelmant, G., Lehman, J.J., Kelly, D.P. and Spiegelman, B.M. 2001. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7), pp. 3820–3825.
- Mineno, J., Okamoto, S., Ando, T., Sato, M., Chono, H., Izu, H., Takayama, M., Asada, K., Mirochnitchenko, O., Inouye, M. and Kato, I. 2006. The expression profile of microRNAs in mouse embryos. *Nucleic Acids Res* 34(6), pp. 1765–1771.
- Mitochondrial Medicine Society's Committee on Diagnosis, Haas, R.H., Parikh, S., Falk, M.J., Saneto, R.P., Wolf, N.I., Darin, N., Wong, L.-J., Cohen, B.H. and Naviaux, R.K. 2008. The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease. *Mol Genet Metab* 94(1), pp. 16–37.
- Moffat, C. and Harper, M.E. 2010. Metabolic functions of AMPK: aspects of structure and of natural mutations in the regulatory gamma subunits. *IUBMB Life* 62(10), pp. 739–745.
- Mohamed, J.S., Hajira, A., Pardo, P.S. and Boriek, A.M. 2014. MicroRNA-149 inhibits PARP-2 and promotes mitochondrial biogenesis via SIRT-1/PGC-1 α network in skeletal muscle. *Diabetes* 63(5), pp. 1546–1559.
- Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.-F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M.J., Patterson, N., Mesirov, J.P., Golub, T.R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E.S., Hirschhorn, J.N., Altshuler, D. and Groop, L.C. 2003. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34(3), pp. 267–273.
- Moritz, C.E.J., Abreu-Vieira, G., Piroli, C., De Senna, P.N., Cardoso, V.V., Wink, M.R., Harthmann, Â. d'Avila, Rücker, B. and Casali, E.A. 2012. Physical training normalizes nucleotide hydrolysis and biochemical parameters in blood serum from streptozotocin-diabetic rats. *Arch Physiol Biochem* 118(5), pp. 253–259.
- Muoio, D.M. and Newgard, C.B. 2008. Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(3), pp. 193–205.
- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) 2016. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet* 387(10027), pp. 1513–1530.

Nemoto, S., Fergusson, M.M. and Finkel, T. 2005. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 α . *J Biol Chem* 280(16), pp. 16456–16460.

Oliveira, R.L.G.S., Ueno, M., de Souza, C.T., Pereira-da-Silva, M., Gasparetti, A.L., Bezerra, R.M.N., Alberici, L.C., Vercesi, A.E., Saad, M.J.A. and Velloso, L.A. 2004. Cold-induced PGC-1 α expression modulates muscle glucose uptake through an insulin receptor/Akt-independent, AMPK-dependent pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287(4), pp. E686–95.

Pal, M., Wunderlich, C.M., Spohn, G., Brönneke, H.S., Schmidt-Supprian, M. and Wunderlich, F.T. 2013. Alteration of JNK-1 signaling in skeletal muscle fails to affect glucose homeostasis and obesity-associated insulin resistance in mice. *PLoS ONE* 8(1), p. e54247.

Patti, M.E., Butte, A.J., Crunkhorn, S., Cusi, K., Berria, R., Kashyap, S., Miyazaki, Y., Kohane, I., Costello, M., Saccone, R., Landaker, E.J., Goldfine, A.B., Mun, E., DeFronzo, R., Finlayson, J., Kahn, C.R. and Mandarino, L.J. 2003. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14), pp. 8466–8471.

Pérez-Schindler, J., Summermatter, S., Salatino, S., Zorzato, F., Beer, M., Balwierz, P.J., van Nimwegen, E., Feige, J.N., Auwerx, J. and Handschin, C. 2012. The corepressor NCoR1 antagonizes PGC-1 α and estrogen-related receptor α in the regulation of skeletal muscle function and oxidative metabolism. *Mol Cell Biol* 32(24), pp. 4913–4924.

Perry, R.J., Zhang, D., Zhang, X.-M., Boyer, J.L. and Shulman, G.I. 2015. Controlled-release mitochondrial protonophore reverses diabetes and steatohepatitis in rats. *Science* 347(6227), pp. 1253–1256.

Petersen, K.F., Befroy, D., Dufour, S., Dziura, J., Ariyan, C., Rothman, D.L., DiPietro, L., Cline, G.W. and Shulman, G.I. 2003. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 300(5622), pp. 1140–1142.

Puigserver, P., Rhee, J., Lin, J., Wu, Z., Yoon, J.C., Zhang, C.Y., Krauss, S., Mootha, V.K., Lowell, B.B. and Spiegelman, B.M. 2001. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPAR γ coactivator-1. *Mol Cell* 8(5), pp. 971–982.

Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M. and Spiegelman, B.M. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92(6), pp. 829–839.

Rasbach, K.A., Gupta, R.K., Ruas, J.L., Wu, J., Naseri, E., Estall, J.L. and Spiegelman, B.M. 2010. PGC-1 α regulates a HIF2 α -dependent switch in skeletal muscle fiber types. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(50), pp. 21866–21871.

Reichkender, M.H., Auerbach, P., Rosenkilde, M., Christensen, A.N., Holm, S., Petersen, M.B., Lagerberg, A., Larsson, H.B.W., Rostrup, E., Mosbeck, T.H., Sjödin, A., Kjaer, A., Ploug, T., Hoejgaard, L. and Stallknecht, B. 2013. Exercise training favors increased insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle in contrast to adipose tissue: a randomized study using FDG PET imaging. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305(4), pp. E496–506.

Ristow, M., Zarse, K., Oberbach, A., Klötting, N., Birringer, M., Kiehntopf, M., Stumvoll, M., Kahn, C.R. and Blüher, M. 2009. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(21), pp. 8665–8670.

Rocha-Rodrigues, S., Rodríguez, A., Gouveia, A.M., Gonçalves, I.O., Becerril, S., Ramírez, B., Beleza, J., Frühbeck, G., Ascensão, A. and Magalhães, J. 2016. Effects

- of physical exercise on myokines expression and brown adipose-like phenotype modulation in rats fed a high-fat diet. *Life Sci* 165, pp. 100–108.
- Röckl, K.S.C., Hirshman, M.F., Brandauer, J., Fujii, N., Witters, L.A. and Goodyear, L.J. 2007. Skeletal muscle adaptation to exercise training: AMP-activated protein kinase mediates muscle fiber type shift. *Diabetes* 56(8), pp. 2062–2069.
- Ropelle, E.R., Pauli, J.R., Prada, P.O., de Souza, C.T., Picardi, P.K., Faria, M.C., Cintra, D.E., Fernandes, M.F. de A., Flores, M.B., Velloso, L.A., Saad, M.J.A. and Carvalheira, J.B.C. 2006. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. *J Physiol (Lond)* 577(Pt 3), pp. 997–1007.
- Rötig, A. and Poulton, J. 2009. Genetic causes of mitochondrial DNA depletion in humans. *Biochim Biophys Acta* 1792(12), pp. 1103–1108.
- Ruas, J.L., White, J.P., Rao, R.R., Kleiner, S., Brannan, K.T., Harrison, B.C., Greene, N.P., Wu, J., Estall, J.L., Irving, B.A., Lanza, I.R., Rasbach, K.A., Okutsu, M., Nair, K.S., Yan, Z., Leinwand, L.A. and Spiegelman, B.M. 2012. A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell* 151(6), pp. 1319–1331.
- Ruderman, N.B., Carling, D., Prentki, M. and Cacicedo, J.M. 2013. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 123(7), pp. 2764–2772.
- Ruiz-Roig, C., Noriega, N., Duch, A., Posas, F. and de Nadal, E. 2012. The Hog1 SAPK controls the Rtg1/Rtg3 transcriptional complex activity by multiple regulatory mechanisms. *Mol Biol Cell* 23(21), pp. 4286–4296.
- Rune, A., Osler, M.E., Fritz, T. and Zierath, J.R. 2009. Regulation of skeletal muscle sucrose, non-fermenting 1/AMP-activated protein kinase-related kinase (SNARK) by metabolic stress and diabetes. *Diabetologia* 52(10), pp. 2182–2189.
- Sabin, M.A., Stewart, C.E.H., Crowne, E.C., Turner, S.J., Hunt, L.P., Welsh, G.I., Grohmann, M.J., Holly, J.M.P. and Shield, J.P.H. 2007. Fatty acid-induced defects in insulin signalling, in myotubes derived from children, are related to ceramide production from palmitate rather than the accumulation of intramyocellular lipid. *J Cell Physiol* 211(1), pp. 244–252.
- Safdar, A., Little, J.P., Stokl, A.J., Hettinga, B.P., Akhtar, M. and Tarnopolsky, M.A. 2011. Exercise increases mitochondrial PGC-1 α content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem* 286(12), pp. 10605–10617.
- Samuel, V.T., Petersen, K.F. and Shulman, G.I. 2010. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* 375(9733), pp. 2267–2277.
- Sano, M., Tokudome, S., Shimizu, N., Yoshikawa, N., Ogawa, C., Shirakawa, K., Endo, J., Katayama, T., Yuasa, S., Ieda, M., Makino, S., Hattori, F., Tanaka, H. and Fukuda, K. 2007. Intramolecular control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α . *J Biol Chem* 282(35), pp. 25970–25980.
- Savage, D.B., Petersen, K.F. and Shulman, G.I. 2007. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev* 87(2), pp. 507–520.
- Scarpulla, R.C. 2006. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* 97(4), pp. 673–683.
- Schroeder, P., Pohl, C., Calles, C., Marks, C., Wild, S. and Krutmann, J. 2007. Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling. *Free Radic Biol Med* 43(1), pp. 128–135.

- Schuler, M., Ali, F., Chambon, C., Duteil, D., Bornert, J.-M., Tardivel, A., Desvergne, B., Wahli, W., Chambon, P. and Metzger, D. 2006. PGC1 α expression is controlled in skeletal muscles by PPAR β , whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. *Cell Metab* 4(5), pp. 407–414.
- Schwarzländer, M., König, A.-C., Sweetlove, L.J. and Finkemeier, I. 2012. The impact of impaired mitochondrial function on retrograde signalling: a meta-analysis of transcriptomic responses. *J Exp Bot* 63(4), pp. 1735–1700.
- Sczelecki, S., Besse-Patin, A., Abboud, A., Kleiner, S., Laznik-Bogoslavski, D., Wrann, C.D., Ruas, J.L., Haibe-Kains, B. and Estall, J.L. 2014. Loss of Pgc-1 α expression in aging mouse muscle potentiates glucose intolerance and systemic inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306(2), pp. E157–67.
- Shieh, J.T.C., Huang, Y., Gilmore, J. and Srivastava, D. 2011. Elevated miR-499 levels blunt the cardiac stress response. *PLoS ONE* 6(5), p. e19481.
- Siengdee, P., Trakooljul, N., Murani, E., Schwerin, M., Wimmers, K. and Ponsuksili, S. 2015. MicroRNAs Regulate Cellular ATP Levels by Targeting Mitochondrial Energy Metabolism Genes during C2C12 Myoblast Differentiation. *PLoS ONE* 10(5), p. e0127850.
- Silveira, L.R., Fiamoncini, J., Hirabara, S.M., Procópio, J., Cambiaghi, T.D., Pinheiro, C.H.J., Lopes, L.R. and Curi, R. 2008. Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. *J Cell Physiol* 217(1), pp. 1–12.
- Stump, C.S., Short, K.R., Bigelow, M.L., Schimke, J.M. and Nair, K.S. 2003. Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(13), pp. 7996–8001.
- Summermatter, S., Thurnheer, R., Santos, G., Mosca, B., Baum, O., Treves, S., Hoppeler, H., Zorzato, F. and Handschin, C. 2012. Remodeling of calcium handling in skeletal muscle through PGC-1 α : impact on force, fatigability, and fiber type. *Am J Physiol, Cell Physiol* 302(1), pp. C88–99.
- Sun, L.-Y., Wang, N., Ban, T., Sun, Y.-H., Han, Y., Sun, L.-L., Yan, Y., Kang, X.-H., Chen, S., Sun, L.-H., Zhang, R., Zhao, Y.-J., Zhang, H., Ai, J. and Yang, B.-F. 2014. MicroRNA-23a mediates mitochondrial compromise in estrogen deficiency-induced concentric remodeling via targeting PGC-1 α . *J Mol Cell Cardiol* 75, pp. 1–11.
- Szkudelski, T. 2012. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp Biol Med (Maywood)* 237(5), pp. 481–490.
- Tadaishi, M., Miura, S., Kai, Y., Kano, Y., Oishi, Y. and Ezaki, O. 2011. Skeletal muscle-specific expression of PGC-1 α -b, an exercise-responsive isoform, increases exercise capacity and peak oxygen uptake. *PLoS ONE* 6(12), p. e28290.
- Tardif, N., Salles, J., Guillet, C., Tordjman, J., Reggio, S., Landrier, J.-F., Giraudet, C., Patrac, V., Bertrand-Michel, J., Migne, C., Collin, M.-L., Chardigny, J.-M., Boirie, Y. and Walrand, S. 2014. Muscle ectopic fat deposition contributes to anabolic resistance in obese sarcopenic old rats through eIF2 α activation. *Aging Cell* 13(6), pp. 1001–1011.
- Taylor, R., Price, T.B., Katz, L.D., Shulman, R.G. and Shulman, G.I. 1993. Direct measurement of change in muscle glycogen concentration after a mixed meal in normal subjects. *Am J Physiol* 265(2 Pt 1), pp. E224–9.
- Tsuchiya, A., Kanno, T. and Nishizaki, T. 2014. PI3 kinase directly phosphorylates Akt1/2 at Ser473/474 in the insulin signal transduction pathway. *J Endocrinol* 220(1), pp. 49–59.
- Velez, J.M., Miriyala, S., Nithipongvanitch, R., Noel, T., Plabplueng, C.D., Oberley, T., Jungsuwadee, P., Van Remmen, H., Vore, M. and St Clair, D.K. 2011. p53 Regulates

oxidative stress-mediated retrograde signaling: a novel mechanism for chemotherapy-induced cardiac injury. *PLoS ONE* 6(3), p. e18005.

Wallace, D.C. 2012. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer* 12(10), pp. 685–698.

Wang, X., Hu, Z., Hu, J., Du, J. and Mitch, W.E. 2006. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: Activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. *Endocrinology* 147(9), pp. 4160–4168.

Whitman, S.A., Long, M., Wondrak, G.T., Zheng, H. and Zhang, D.D. 2013. Nrf2 modulates contractile and metabolic properties of skeletal muscle in streptozotocin-induced diabetic atrophy. *Exp Cell Res* 319(17), pp. 2673–2683.

Wong, K.E., Mikus, C.R., Slentz, D.H., Seiler, S.E., DeBalsi, K.L., Ilkayeva, O.R., Crain, K.I., Kinter, M.T., Kien, C.L., Stevens, R.D. and Muoio, D.M. 2015. Muscle-Specific Overexpression of PGC-1 α Does Not Augment Metabolic Improvements in Response to Exercise and Caloric Restriction. *Diabetes* 64(5), pp. 1532–1543.

Wright, G.L., Maroulakou, I.G., Eldridge, J., Liby, T.L., Sridharan, V., Tsichlis, P.N. and Muise-Helmericks, R.C. 2008. VEGF stimulation of mitochondrial biogenesis: requirement of AKT3 kinase. *FASEB J* 22(9), pp. 3264–3275.

Wueest, S., Rapold, R.A., Schumann, D.M., Rytka, J.M., Schildknecht, A., Nov, O., Chervonsky, A.V., Rudich, A., Schoenle, E.J., Donath, M.Y. and Konrad, D. 2010. Deletion of Fas in adipocytes relieves adipose tissue inflammation and hepatic manifestations of obesity in mice. *J Clin Invest* 120(1), pp. 191–202.

Wu, H., Deng, X., Shi, Y., Su, Y., Wei, J. and Duan, H. 2016. PGC-1 α , glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol*.

Xie, Y. and Chen, Y. 2016. microRNAs: Emerging Targets Regulating Oxidative Stress in the Models of Parkinson's Disease. *Front Neurosci* 10, p. 298.

Xue, Y., Wei, Z., Ding, H., Wang, Q., Zhou, Z., Zheng, S., Zhang, Y., Hou, D., Liu, Y., Zen, K., Zhang, C.-Y., Li, J., Wang, D. and Jiang, X. 2015. MicroRNA-19b/221/222 induces endothelial cell dysfunction via suppression of PGC-1 α in the progression of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 241(2), pp. 671–681.

Xu, Y., Zhao, C., Sun, X., Liu, Z. and Zhang, J. 2015. MicroRNA-761 regulates mitochondrial biogenesis in mouse skeletal muscle in response to exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 467(1), pp. 103–108.

Yang, J., Liu, X., Xu, B., Zhao, N., Yang, X. and Zhang, M. 2013. Identification of miRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis in cytoplasmic male-sterile and its maintainer fertile lines of *Brassica juncea*. *BMC Genomics* 14, p. 9.

Zhang, Y., Yang, L., Gao, Y.-F., Fan, Z.-M., Cai, X.-Y., Liu, M.-Y., Guo, X.-R., Gao, C.-L. and Xia, Z.-K. 2013. MicroRNA-106b induces mitochondrial dysfunction and insulin resistance in C2C12 myotubes by targeting mitofusin-2. *Mol Cell Endocrinol* 381(1-2), pp. 230–240.

Zhao, X., Ren, X., Zhu, R., Luo, Z. and Ren, B. 2016. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria-mediated apoptosis in zebrafish embryos. *Aquat Toxicol* 180, pp. 56–70.

Apêndice

8. Apêndice

8.1. Apêndice A

Tabela 3 - Lista de microRNAs com afinidade pela 3'UTR do mRNA de PGC-1 α

miRNA	Site_C	Seed_C	Offseed_C	dG_hybrid	TargetMatch	MirMatch
mmu-miR-466m-3p	0.9817	0.9616	0.9935	-31.8	GUGUG GUGUGUGUAUGU G	CACAC UACACACAUACAU
mmu-miR-669c-3p	0.9848	0.9979	0.9795	-30.5	UGC UGUGU GUGUGUGUGUG	AUG ACACA CACACACACAU
mmu-miR-215-3p	1	1	1	-30	GGCU GGAAUGACAGA	CCGG UCUUACUGUCU
mmu-miR-696	0.9999	1	0.9999	-29.8	UC CAGUAAGCACAC GU	GG GUCGUUCGUGUGCG
mmu-miR-669c-3p	0.9836	0.9959	0.9779	-29.6	UGC UGUGUGU GUGUGUGUG	AUG ACACACA CACACACAU
mmu-miR-669c-3p	0.9926	0.9744	0.9976	-28.7	UGC UGUGUGU GUGUGUGUA	AUG ACACACA CACACACAU
mmu-miR-669c-3p	0.9822	0.9834	0.9815	-28.5	UGC UGUGUGU UGUGUGUG	AUG ACACACA ACACACAU
mmu-miR-669c-3p	0.991	0.9981	0.9839	-28.4	UGUGUGUGUGUG UA	ACACACACACACAU
mmu-miR-466f-3p	0.9806	0.9634	0.9926	-28.2	GUGUG GUGUGUGUAUG	CAUAC CACACACAUAC
mmu-miR-539-5p	0.9983	0.9973	0.9989	-27.1	CAUACU AGGA AUUUCUCC	GUGUGG UCCU UAAAGAGG
mmu-miR-3100-5p	0.9757	0.9577	0.9806	-26.8	CCU GGGACA C UG UUCCCAA	GGG UUCUGU G GC AAGGGUU
mmu-miR-1953	0.9666	0.9463	0.9775	-25.2	GGA AGC UG CUUUCCCA	UCU UCG AC GAAAGGGU
mmu-miR-322-5p	0.6998	0.09033	0.903	-25.2	CGG ACAUGAA GCUGCUG	GUU UGUACUU CGACGAC

mmu-miR-1968-5p	0.751	0.2636	0.9948	-25.1	GGUUUAC ACAGCUGC	UCAGGUG UGUCGACG
mmu-miR-5623-5p	0.7181	0.151	0.9307	-24.9	G UU UGA CAGCUGCU	C AA ACU GUCGACGG
mmu-miR-5097	0.2894	0.9602	0.2089	-24.3	GGC CCUGAAC AGGG G	CCG GGACUUG UCCC U
mmu-miR-470-5p	0.9749	0.9845	0.9724	-24.2	CUCAU GG GC GU CCAAGA	GAGUG UC CG CA GGUUCU
mmu-miR-467h	0.8863	0.8614	0.8972	-23.6	GCAU CAUG ACACACUUA	UGUA GUAC UGUGUGAAU
mmu-miR-497-5p	0.6241	0.09033	0.8704	-23.5	UACA CACA GCUGCUG	AUGU GUGU CGACGAC
mmu-miR-99b-5p	1	1	0.9999	-23.5	GCA GUU UUC ACGGGUG	CGU CAG AAG UGCCCAC
mmu-miR-1953	0.9994	0.9983	0.9999	-23.3	CGGG AGCUU GCUUUCCC	GUCU UCGGA UGAAAGGG
mmu-miR-1198-5p	0.9694	0.8832	0.9952	-22.7	CAAG CGGU CA GAACACA	GUUC GUCG GU CUUGUGU
mmu-miR-490-5p	0.5317	0.981	0.4033	-22.6	ACCC C UGG AG UCCAUG	UGGG G ACC UC AGGUAC
mmu-miR-3966	0.1592	0.654	0.03976	-22.5	ACAG C A GGC UGGCAGC	UGUC G U UCG ACCGUCG
mmu-miR-1955-5p	0.9999	0.999	1	-22.4	AGGCUG GG UG CA CC UGGGAC	UUCGAC UC AC GU GG ACCCUG
mmu-miR-450b-3p	0.9579	0.9621	0.9546	-22	GCGUGU UUCCCAA	CGUACG AAGGGUU
mmu-miR-468-3p	0.9943	0.9957	0.9937	-21.9	AGAC C GCA AGUCAUA	UCUG G CGU UCAGUAU
mmu-miR-467e-5p	0.8863	0.8614	0.8972	-21.8	GCAU CAUG CACACUUA	UGUA GUAC GUGUGAAU
mmu-miR-1931	0.9735	0.9993	0.9665	-21.8	CA CGUG CC AG CUCUUGCA	GU GCGU GG UC GGGAACGU
mmu-miR-3059-5p	1	1	1	-21.8	CCC GGC GAGGAA	GGG CCG CUCCUU

mmu-miR-5097	0.9938	0.9994	0.992	-21.7	CC GAACA GG ACAUGAAC	GG CUUGU CC UGUACUUG
mmu-miR-320-3p	1	1	0.9999	-21.7	CGUUU UUC G UCAGCUUU	GCGGG GAG U GGUCGAAA
mmu-let-7i-5p	1	1	1	-21.7	GACAG A AGAU UACCUCA	UUGUC U UUUG AUGGAGU
mmu-miR-668-5p	0.8863	0.8614	0.8972	-21.6	GC UU CC UGA G CACACUUA	CG AG GG GCU C GUGUGAAU
mmu-miR-382-5p	0.9239	0.9937	0.9006	-21.6	UGAA CACU AC ACAACUUC	GCUU GUGG UG UGUUGAAG
mmu-miR-3081-5p	0.4156	0.9998	0.3026	-21.6	GCUGCU CAAG UCCAGU	UGGCGA GUUC AGGUCA
mmu-miR-15b-5p	0.6739	0.09033	0.8928	-21.5	GU CAUGA GCUGCUG	CA GUACU CGACGAU
mmu-miR-1197-3p	0.9704	0.944	0.9967	-21.5	GGAC GUGUCCU	UCUG CACAGGA
mmu-miR-669c-5p	0.9246	0.9977	0.8953	-21.5	ACACAC AC UACAACU	UGUGUG UG GUGUUGA
mmu-miR-7b-3p	0.9858	0.9947	0.9825	-21.2	UG G UG GU UGUG ACUUGUU	AC C AC CG ACAC UGAACAA
mmu-miR-5710	0.9757	0.9717	0.977	-21.1	CCU ACA GUG UCCCAAGA	GGA UGU UAC AGGGUUCU
mmu-miR-761	0.6998	0.05933	0.9133	-21.1	CGGUUU CAC CUGCUG	GUCAAA GUG GACGAC
mmu-miR-3082-5p	0.7512	0.303	0.9957	-21.1	UAC UACAC CUCUGU	GUG GUGUG GAGACA
mmu-miR-431-5p	0.9616	0.986	0.9504	-21.1	GCGUG CCU CAAGAC	CGUAC GGA GUUCUG
mmu-miR-186-3p	0.9938	1	0.9921	-21.1	CCCAAGA UCAU CUUAGG	GGGUUUU AGUG GAAUCC
mmu-miR-503-5p	0.6998	0.09033	0.903	-20.9	CGGU AC UG C GCUGCUG	GUCA UG AC G CGACGAU
mmu-miR-7a-2-3p	0.9859	0.9947	0.983	-20.8	UGUG GUA G UG G G ACUUGUU	ACAC CGU C AC C C UGAACAA

mmu-miR-466k	0.8884	0.8065	0.9235	-20.6	GCAU CAUG A ACACAC	UGUA GUAC U UGUGUG
mmu-miR-300-3p	0.9767	0.9993	0.9715	-20.6	GGGA AGC UGU UCUUGCA	UUCU UCG ACG GGAACGU
mmu-miR-325-3p	1	1	1	-20.5	UGA AG GAG UG UCAUA	ACU UC CUC AC AGUUAU
mmu-miR-1906	0.6876	0.05933	0.9094	-20.3	GGUUU UG CA GCUGCUG	UCGGG AC GU CGACGAC
mmu-miR-124-5p	0.9907	0.987	0.9929	-20.2	CAA GGUUU UGAACAC	GUU CCAGG ACUUGUG
mmu-miR-15a-5p	0.5799	0.09033	0.8469	-20.2	CAUGAAC CA GCUGCUG	GUGUUUG GU CGACGAU
mmu-miR-1190	0.8051	0.302	0.9938	-20.1	ACGG GAAC CAGCUG	UGUC CUUG GUCGAC
mmu-miR-329-3p	0.9884	0.9715	0.9985	-20.1	GGGU GC GUGUGU	UCCA CG CACACA
mmu-miR-202-3p	1	1	0.9999	-20	UUCCCA GC G AUACCUC	AAGGGU CG C UAUGGAG
mmu-let-7g-5p	1	1	1	-20	GGCUG ACAGA G UACCUCA	UUGAC UGUUU U AUGGAGU
mmu-miR-466f-5p	0.9474	1	0.9244	-20	AUG CA GUA GCACACGU	UAC GU CGU UGUGUGCA
mmu-miR-669e-5p	0.9728	0.986	0.969	-19.8	AUGG GCGUGU C C CAAGAC	UACU UGUACG G G GUUCUG
mmu-miR-16-5p	0.7323	0.09033	0.9158	-19.6	CAA GUUUAC GCUGCUG	GUU UAAAUG CGACGAU
mmu-miR-667-3p	0.9999	0.9998	1	-19.5	CGGGUGUCA	GUCCACAGU
mmu-miR-122-5p	0.9454	0.9587	0.9408	-19.4	GAAU CC UUACACUCU	UUUG GG AGUGUGAGG
mmu-miR-329-5p	0.8737	0.9955	0.8466	-19.4	GGCAG AGAC C AAAACCU	UUGUC UCUG G UUUUGGA

mmu-miR-494-5p	0.999	0.998	1	-19.3	ACAACA ACAACC	UGUUGU UGUUGG
mmu-miR-30e-5p	0.9929	0.9947	0.9923	-19.3	CCAG CAAG GUUUACA	GGUC GUUC CAAAUGU
mmu-miR-669o-5p	0.9241	0.9977	0.9089	-19.3	GCAU CAUG CACAC ACAACU	UGUA GUAC GUGUG UGUUGA
mmu-miR-574-5p	0.9817	0.9587	0.9955	-19.1	CUC UAC UACACUC	GAG GUG GUGUGAG
mmu-miR-1907	0.8533	0.09033	0.9738	-19	ACC CCAGA UU GCUGCU	UGG GGUCU AG CGACGA
mmu-let-7f-5p	1	1	1	-18.8	AU UC UACCUCA	UG AG AUGGAGU
mmu-let-7b-5p	1	1	1	-18.8	AAU ACA AG UACCUCA	UUG UGU UU AUGGAGU
mmu-let-7c-5p	1	1	1	-18.7	GAC AU UC UACCUCA	UUG UG GG AUGGAGU
mmu-miR-335-5p	0.998	1	0.9968	-18.7	UUUC UG GCUCUUGG	AAAG AU CGAGAACU
mmu-miR-135b-3p	0.9188	0.9988	0.8959	-18.6	UCCAUG CUU CCUACA	GGGUAC GAA GGAUGU
mmu-miR-466i-5p	0.8884	0.8065	0.9235	-18.6	GCAU CAU A ACACAC	UGUG GUG U UGUGUG
mmu-miR-98-5p	1	1	1	-18.5	GACAG GAU UACCUCA	UUGUU UUG AUGGAGU
mmu-miR-763	0.787	0.302	0.9948	-18.4	GGUUU C CAGCUG	CCAAG G GUCGAC
mmu-let-7a-5p	1	1	1	-17.9	AU UC UACCUCA	UG GG AUGGAGU
mmu-let-7e-5p	1	1	1	-17.9	AU UC UACCUCA	UG GG AUGGAGU
mmu-miR-669b-5p	0.8914	1	0.8371	-17.7	UGUACA ACAAAAC	ACGUGU UGUUUUG

mmu-miR-195-5p	0.7323	0.09033	0.9158	-17.7	CAA GUUU UG GCUGCUG	GUU UAAA AC CGACGAU
mmu-miR-669e-5p	0.9905	0.999	0.9877	-17.5	AACA CAUAC ACAAGA CA	UUGU GUGUG UGUUCU GU
mmu-miR-1191	0.9715	0.9863	0.967	-17.5	GGG C GCGU GU AAGACU	CCC G UGUA CA UUCUGA
mmu-miR-5617-5p	0.4353	0.8642	0.3839	-17.4	CAGA GGGC CCC U	GUCU UCCG GGG A
mmu-miR-669e-5p	0.9901	0.999	0.9866	-17.2	AACA CAUAC ACAAGA	UUGU GUGUG UGUUCU
mmu-miR-5101	0.8693	1	0.8281	-17.1	CUGUA CA UAAAAC AAACAAA	GACGU GU GUUUUG UUUGUUU
mmu-miR-493-5p	0.8096	0.6542	0.8645	-17.1	CCUACU UGUACAA	GGAUGG ACAUGUU
mmu-miR-450a-1-3p	0.9579	0.9621	0.9546	-17.1	GCG UUCCCAA	CGU AAGGGUU
mmu-miR-30a-5p	0.9929	0.9947	0.9923	-17	CCAG GA GUUUACA	GGUC CU CAA AUGU
mmu-miR-344d-2-5p	0.9799	0.9823	0.9762	-16.4	CCA ACCAGA	GGU UGGUCU
mmu-let-7d-5p	1	1	1	-16.4	GGCUG G AAU AC UACCUC	UUGAU C UUG UG AUGGAG
mmu-miR-3970	0.9991	0.998	0.9998	-16.3	AA ACA AC ACAACC	UU UGU UG UGUUGG
mmu-miR-5101	0.8367	1	0.7666	-16.2	CUGUA CAAAA AAACAAA	GACGU GUUUU UUUGUUU
mmu-miR-133a-5p	0.9779	0.9758	0.982	-16.1	CCA UACCAG	GGU AUGGUC
mmu-miR-218-5p	0.8473	1	0.7879	-16.1	ACA GAU UAAGCACA	UGU CUA GUUCGUGU
mmu-miR-30d-5p	0.9929	0.9947	0.9923	-15.9	CCAG GA GUUUACA	GGUC CU CAA AUGU
mmu-miR-669b-5p	1	1	1	-15.7	AUGU CGU UAUACAAAA	UACG GUA GUGUGUUUU

mmu-miR-214-3p	0.7116	0.05933	0.9175	-15.7	AC GUUU UG CUGCUG	UG CGGA AC GACGAC
mmu-miR-10a-3p	0.9879	0.9968	0.9861	-15.7	UUUCCC AGA UGC GAAUUU	AAGGGG UCU AUG CUUAAA
mmu-miR-3066-5p	0.9946	0.991	1	-15.6	ACA CAACCA	UGU GUUGGU
mmu-miR-5623-3p	0.9893	0.9875	1	-15.6	CCAGAAC	GGUCUUG
mmu-miR-451	0.9909	0.9891	0.9917	-15.4	AC CAG AACGGUUU	UG GUC UUGCCAAA
mmu-miR-26a-2-3p	0.9939	0.9957	0.9922	-15.4	CAAGAACA GG	GUUCUUGU CC
mmu-miR-881-5p	0.4033	0.4705	0	-15.4	CUCUCUG	GAGAGAC
mmu-miR-375-3p	0.9898	0.9945	0.9882	-15.2	CA CC GAAC GAACAA	GU GG CUUG CUUGUU
mmu-miR-26a-2-3p	0.9968	0.9957	1	-15.2	CAAGAACA	GUUCUUGU
mmu-miR-1961	1	1	1	-15.2	GAU UACCUCA	UUG AUGGAGU
mmu-miR-34a-3p	0.6721	0.0365	0.8728	-15.1	CGGU UAC UGCUGA	GUCA AUG ACGACU
mmu-miR-410-5p	0.9987	0.998	1	-15	ACA ACAACC	UGU UGUUGG
mmu-let-7g-3p	0.4995	0.6542	0.0355	-15	UCUGUACA	GGACAUGU
mmu-miR-467b-5p	0.8885	0.8642	0.8977	-15	CAU CAUG AG CACUUA	GUA GUAC UC GUGAAU
mmu-miR-5615-5p	0.9932	0.991	1	-14.9	AACAACCA	UUGUUGGU
mmu-miR-142-5p	0.9968	0.9925	0.9986	-14.9	UAG UUUCU ACUUUA	AUC AAAGA UGAAAU
mmu-miR-501-5p	1	1	1	-14.8	UUCG UCUA AAAGGA	AAGU GGGU UUUCCU

mmu-miR-495-5p	0.9239	0.9927	0.9051	-14.7	UGAAGA UAA CAACUUC	GCUUUU AUU GUUGAAG
mmu-miR-374-3p	0.8797	0.9988	0.8586	-14.5	UGG GCA AUGA GA UACAACU	GCC UGU UACU UU AUGUUGG
mmu-miR-380-5p	0.9864	0.991	0.959	-14	CAACCAU	GUUGGUA
mmu-miR-19b-2-5p	0.8515	1	0.7958	-13.9	CUG AC AAU CAAAAC	GAC UG UUUA GUUUUG
mmu-miR-706	0.9984	0.9968	1	-13.8	UAGG UUUCUC	GUCC AAAGAG
mmu-miR-335-5p	0.9693	0.9975	0.9599	-13.8	GCGU UUUC CUCUUG	UGUA AAAG GAGAAC
mmu-miR-384-3p	0.9961	1	0.9949	-13.6	GA GCAA UUAGGAAU	CU UGUU GAUCCUUA
mmu-miR-568	1	1	1	-13.5	UGU GUAU UAUACA	ACA UAUG AUAUGU
mmu-let-7a-2-3p	0.5627	0.5627	NM	-13.4	CUGUACA	GACAUGU
mmu-miR-881-3p	0.9133	0.7003	0.9948	-13.2	CGG G ACACAG	GUC C UGUGUC
mmu-miR-375-3p	0.9887	0.9993	0.9834	-13	CA CC GAACAAG	GU GG CUUGUUU
mmu-miR-411-3p	0.9942	0.9978	0.9907	-13	AC GU UUACAUG	UG CA AAUGUAU
mmu-miR-22-5p	0.9928	0.997	0.9893	-12.8	CCA AAGAAC	GGU UUCUUG
mmu-miR-26a-2-3p	0.9888	0.9987	0.9839	-12.8	AACAA AGAACA	UUGUU UCUUGU
mmu-miR-26b-3p	0.9918	0.9957	0.9898	-12.8	CCAG AGAACA GG	GGUU UCUUGU CC
mmu-miR-19b-1-5p	0.8515	1	0.7958	-12.6	CUG AAU CAAAAC	GAC UUUG GUUUUG
mmu-miR-759	0.8876	0.8015	0.9037	-12.6	GUCA GAAUU UUU CACUCU GU	CAGU UUUAA AAA GUGAGA CG

mmu-miR-759	0.9624	0.8015	0.9969	-12.6	GUCA GAAUU UUU CACUCU	CAGU UUUAA AAA GUGAGA
mmu-miR-544-5p	0.9989	0.9993	0.996	-12.5	AACAAGA	UUGUUCU
mmu-miR-26b-3p	0.9881	0.9957	0.9845	-12.5	CCA AGAACA	GGU UCUUGU
mmu-miR-3084-5p	0.964	0.992	0.9529	-12.4	ACUU CUUCA	UGAG GAAGUU
mmu-miR-669b-5p	0.7243	0.9622	0.5816	-12.3	CAC UGU ACAAAA	GUG ACG UGUUUU
mmu-miR-5102	0.9875	0.9875	NM	-12.3	CCAGAA	GGUCUU
mmu-miR-30b-5p	0.9954	0.9947	1	-11.9	GUUUACA	CAA AUGU
mmu-miR-30c-5p	0.9954	0.9947	1	-11.9	GUUUACA	CAA AUGU
mmu-miR-384-5p	0.9954	0.9947	1	-11.9	GUUUACA	CAA AUGU
mmu-miR-684	1	1	1	-11.8	GGAAAAU	CCUUUUG
mmu-let-7c-1-3p	0.6542	0.6542	NM	-11.7	UGUACA	ACAUGU
mmu-miR-218-2-3p	0.9914	0.9842	1	-11.6	ACA AACCAU	UGU UUGGUA
mmu-miR-379-3p	0.9942	0.9978	0.9907	-11.5	AC GU UUACAUG	UG UA AAUGUAU
mmu-miR-466g	0.344	0.344	NM	-11.5	UCUGUA	AGACAU
mmu-miR-26b-3p	0.9845	0.9987	0.9724	-11.4	CCA UA AGAACA	GGU AU UCUUGU
mmu-miR-19a-5p	0.9359	1	0.9085	-11.2	GU CAA UA CAAAAC	CA GUU AU GUUUUG
mmu-miR-374-3p	1	1	1	-11	UCG AU AUACAA	AGC UG UAUGUU

mmu-miR-3112-5p	1	1	1	-11	UGUU	UUCUAU	ACGG	AAGUA
mmu-miR-129-5p	0.7043	0.9582	0.5351	-10.7	CUC CAAAAA	CUG	GGG	GGC GUUUUU
mmu-let-7d-3p	1	1	NM	-10.4	UCGUAU		AGCAUA	
mmu-miR-1196-3p	0.9768	0.9768	NM	-9.7	AAAACC		UUUUGG	
mmu-miR-544-5p	0.9997	0.9997	NM	-9.1	UAACAA		AUUGUU	
mmu-miR-544-5p	1	1	NM	-9.1	UAACAA		AUUGUU	
mmu-miR-543-3p	0.9963	1	0.9931	-9	ACU	AAUGUU	UGG	UUACAA
mmu-miR-325-3p	0.9997	0.9997	NM	-8.6	CAAUAA		GUUAUU	
mmu-miR-325-3p	1	1	NM	-8.6	CAAUAA		GUUAUU	

8.2. Apêndice B – Genotipagem dos camundongos transgênicos para AMPK e SNARK

Figura 32. Genotipagem de camundongos AMPK γ 3

Banda esperada - 650 bp. Camundongos selvagens apresentam uma única banda de 400 bp.

Figura 33. Genotipagem de camundongos AMPK α 2 DN

Banda esperada - 500 bp. Camundongos selvagens apresentam uma única banda de 230 bp.

Figura 344. Genotipagem de camundongos SNARK DN e SNARK SWT

Banda esperada 424 e ~300 bp; SNARK WT – banda esperada 424 e ~300 bp. Camundongos selvagens apresentam uma única banda de 424 bp.

8.4. Apêndice D

Tabela 4. Lista de primers para qRT-PCR

S – Senso; As – Antisenso.

Primers	Sequência
ATP5 a 1 S	CTGTACTGCATCTACGTCGC
ATP5 a 1 AS	TTGTCGGGTTCCAAGTTCAG
COX 5a S	TGTTGGCTATGATCTGGTTCC
COX 5a AS	TTATGAGGTCCTGCTTTGTCC
COX II S	CCA TCC CAG GCC GAC TAA
COX II AS	AAT TTC AGA GCA TTG GCC ATA GA
CS S	GTGTCAGATGAGAAGTTACGAGAC
CS AS	TCCTTAGGCAGATGTTTCAG
CYCS S	AGGCAAGCATAAGACTGGAC
CYCS AS	ACTCCATCAGGGTATCCTCTC
NRF1 S	TGCCCAAGTGAATTACTCTGC
NRF1 AS	TCGTCTGGATGGTCATTTAC
NRF2 S	AGGTTGCCCACATTCCCAAACAAG
NRF2 AS	TTGCTCCATGTCCTGCTCTATGCT
PDK4 S	GGATTACTGACCGCCTCTTTAG
PDK4 AS	GTAACCAAAACCAGCCAAAGG
PGC1 α S	CAAGCCAAACCAACAACCTTTATCTCT
PGC1 α AS	CACACTTAAGGTTGCTCAAAAGT

PGC1 β S	TCCTGTAAAAGCCCGGAGTAT
PGC1 β AS	GCTCTGGTAGGGGCAGTGA
GLUT1 S	GCTTCTCCAACTGGACCTCAAAC
GLUT1 AS	ACGAGGAGCACCGTGAAGATGA
GLUT4 S	ACCGGCAGCCTCTGATCATCG
GLUT4 AS	AGCCGACTCGAAGATGCTGGTTG
PPAR- γ S	GTACTGTCGGTTTCAGAAGTGCC
PPAR- γ AS	ATCTCCGCCAACAGCTTCTCCT
<i>RPL39</i> S	CAAATCGCCCTATTCCTCA
<i>RPL39</i> AS	AGACCCAGCTTCGTTCTCCT
SIRT1 S	CAGTGTCATGGTTCCTTTGC
SIRT1 AS	CACCGAGGAACTACCCTGAT
SNARK S	CTGCCACCAGAACGGGATCGT
SNARK AS	AGGGCTCCCACAGAACGTCTGG
TFAM S	CACCCAGATGCAAACTTTTCAG
TFAM AS	CTGCTCTTTATACTTGCTCACAG
UCP2 S	CAGTTCTACACCAAGGGCTC
UCP2 AS	AGCATGGTAAGGGCACAGTG
UCP3 S	ATGAGTTTTGCCTCCATTG
UCP3 AS	GGCGTATCATGGCTTGAAAT
GAPDH S	AGGCCGGTGCTGAGTATGTC
GAPDH AS	TGCCTGCTTCACCACCTTCT

8.5. Apêndice E – ARTIGOS PUBLICADOS

- 1) Barbosa, M.R., Sampaio, I.H., Teodoro, B.G., Sousa, T.A., Zoppi, C.C., **Queiroz, A.L.**, Passos, M.A., Alberici, L.C., Teixeira, F.R., Manfiolli, A.O., Batista, T.M., Cappelli, A.P.G., Reis, R.I., Frasson, D., Kettelhut, I.C., Parreiras-e-Silva, L.T., Costa-Neto, C.M., Carneiro, E.M., Curi, R. and Silveira, L.R. 2013. Hydrogen peroxide production regulates the mitochondrial function in insulin resistant muscle cells: effect of catalase overexpression. *Biochim Biophys Acta* 1832(10), pp. 1591–1604.
- 2) Lopes, R.A.M., Neves, K.B., Pestana, C.R., **Queiroz, A.L.**, Zanotto, C.Z., Chignalia, A.Z., Valim, Y.M., Silveira, L.R., Curti, C. and Tostes, R.C. 2014. Testosterone induces apoptosis in vascular smooth muscle cells via extrinsic apoptotic pathway with mitochondria-generated reactive oxygen species involvement. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306(11), pp. H1485–94.
- 3) Teodoro, B.G., Baraldi, F.G., Sampaio, I.H., Bomfim, L.H.M., **Queiroz, A.L.**, Passos, M.A., Carneiro, E.M., Alberici, L.C., Gomis, R., Amaral, F.G., Cipolla-Neto, J., Araújo, M.B., Lima, T., Akira Uyemura, S., Silveira, L.R. and Vieira, E. 2014. Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and insulin resistance in rat skeletal muscle. *J Pineal Res* 57(2), pp. 155–167.
- 4) Almeida, C., DeMaman, A., Kusuda, R., Cadetti, F., Ravanelli, M.I., **Queiroz, A.L.**, Sousa, T.A., Zanon, S., Silveira, L.R. and Lucas, G. 2015. Exercise therapy normalizes BDNF upregulation and glial hyperactivity in a mouse model of neuropathic pain. *Pain* 156(3), pp. 504–513.
- 5) Lessard, S.J., Rivas, D.A., So, K., Koh, H.-J., **Queiroz, A.L.**, Hirshman, M.F., Fielding, R.A. and Goodyear, L.J. 2016. The AMPK-related kinase SNARK regulates muscle mass and myocyte survival. *J Clin Invest* 126(2), pp. 560–570.
- 6) Teodoro, B.G., Sampaio, I.H., Bomfim, L.H.M., **Queiroz, A.L.**, Silveira, L.R., Souza, A.O., Fernandes, A.M.A.P., Eberlin, M.N., Huang, T.-Y., Zheng, D., Neufer, P.D., Cortright, R.N. and Alberici, L.C. 2016. Long-Chain Acyl-CoA Synthetase 6 regulates lipid synthesis and mitochondrial oxidative capacity in human and rat skeletal muscle. *J Physiol (Lond)*.
- 7) Lima, T.I., Araujo, H.N., Menezes, E.S., Sponton, C.H., Araújo, M.B., Bomfim, L.H.M., **Queiroz, A.L.**, Passos, M.A., E Sousa, T.A., Hirabara, S.M., Martins, A.R., Sampaio, H.C.L.B., Rodrigues, A., Curi, R., Carneiro, E.M., Boschero, A.C. and Silveira, L.R. 2016. Role of microRNAs on the Regulation of Mitochondrial Biogenesis and Insulin Signaling in Skeletal Muscle. *J Cell Physiol*.
- 8) QUEIROZ, André Lima et al. MicroRNA *miR-696* is regulated by SNARK and induces mitochondrial dysfunction in diabetic skeletal muscle through PGC-1 α inhibition. Dez. 2016. **(Manuscrito em fase de submissão)**

Hydrogen peroxide production regulates the mitochondrial function in insulin resistant muscle cells: effect of catalase overexpression.

Barbosa MR¹, Sampaio IH, Teodoro BG, Sousa TA, Zoppi CC, Queiroz AL, Passos MA, Alberici LC, Teixeira FR, Manfiolli AO, Batista TM, Cappelli AP, Reis RI, Frasson D, Kettelhut IC, Parreiras-e-Silva LT, Costa-Neto CM, Carneiro EM, Curi R, Silveira LR.

Abstract

The mitochondrial redox state plays a central role in the link between mitochondrial overloading and insulin resistance. However, the mechanism by which the ROS induce insulin resistance in skeletal muscle cells is not completely understood. We examined the association between mitochondrial function and H₂O₂ production in insulin resistant cells. Our hypothesis is that the low mitochondrial oxygen consumption leads to elevated ROS production by a mechanism associated with reduced PGC1 α transcription and low content of phosphorylated CREB. The cells were transfected with either the encoded sequence for catalase overexpression or the specific siRNA for catalase inhibition. After transfection, myotubes were incubated with palmitic acid (500 μ M) and the insulin response, as well as mitochondrial function and fatty acid metabolism, was determined. The low mitochondrial oxygen consumption led to elevated ROS production by a mechanism associated with β -oxidation of fatty acids. Rotenone was observed to reduce the ratio of ROS production. The elevated H₂O₂ production markedly decreased the PGC1 α transcription, an effect that was accompanied by a reduced phosphorylation of Akt and CREB. The catalase transfection prevented the reduction in the phosphorylated level of Akt and upregulated the levels of phosphorylated CREB. The mitochondrial function was elevated and H₂O₂ production reduced, thus increasing the insulin sensitivity. The catalase overexpression improved mitochondrial respiration protecting the cells from fatty acid-induced, insulin resistance. This effect indicates that control of hydrogen peroxide production regulates the mitochondrial respiration preventing the insulin resistance in skeletal muscle cells by a mechanism associated with CREB phosphorylation and β -oxidation of fatty acids.

Copyright © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

KEYWORDS:

5, 5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid); Akt; CAT; CREB; Catalase and muscle cells; CoQ; Cu,Zn-SOD; Cu,Zn-superoxide dismutase.

PMID: 23643711

DOI: [10.1016/j.bbadis.2013.04.029](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.04.029)

[PubMed - indexed for MEDLINE]

Testosterone induces apoptosis in vascular smooth muscle cells via extrinsic apoptotic pathway with mitochondria-generated reactive oxygen species involvement.

Lopes RA¹, Neves KB², Pestana CR², Queiroz AL³, Zanotto CZ³, Chignalia AZ³, Valim YM², Silveira LR⁴, Curti C², Tostes RC³.

Abstract

Testosterone exerts both beneficial and harmful effects on the cardiovascular system. Considering that testosterone induces reactive oxygen species (ROS) generation and ROS activate cell death signaling pathways, we tested the hypothesis that testosterone induces apoptosis in vascular smooth muscle cells (VSMCs) via mitochondria-dependent ROS generation. Potential mechanisms were addressed. Cultured VSMCs were stimulated with testosterone (10^{-7} mol/l) or vehicle (2-12 h) in the presence of flutamide (10^{-5} mol/l), CCCP (10^{-6} mol/l), mimetic manganese(III) tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin (MnTMPyP; 3×10^{-5} mol/l), Z-Ile-Glu(O-Me)-Thr-Asp(O-Me) fluoromethyl ketone (Z-IETD-FMK; 10^{-5} mol/l), or vehicle. ROS were determined with lucigenin and dichlorodihydrofluorescein; apoptosis, with annexin V and calcein; O₂ consumption, with a Clark-type electrode, and procaspases, caspases, cytochrome c, Bax, and Bcl-2 levels by immunoblotting. Testosterone induced ROS generation (relative light units/mg protein, 2 h; 162.6 ± 16 vs. 100) and procaspase-3 activation [arbitrary units, (AU), 6 h; 166.2 ± 19 vs. 100]. CCCP, MnTMPyP, and flutamide abolished these effects. Testosterone increased annexin-V fluorescence (AU, 197.6 ± 21.5 vs. 100) and decreased calcein fluorescence (AU, 34.4 ± 6.4 vs. 100), and O₂ consumption (nmol O₂/min, 18.6 ± 2.0 vs. 34.4 ± 3.9). Testosterone also reduced Bax-to-Bcl-2 ratio but not cytochrome-c release from mitochondria. Moreover, testosterone (6 h) induced cleavage of procaspase 8 (AU, 161.1 ± 13.5 vs. 100) and increased gene expression of Fas ligand ($2(\Delta\Delta Ct)$, 3.6 ± 1.2 vs. 0.7 ± 0.5), and TNF- α (1.7 ± 0.4 vs. 0.3 ± 0.1). CCCP, MnTMPyP, and flutamide abolished these effects. These data indicate that testosterone induces apoptosis in VSMCs via the extrinsic apoptotic pathway with the involvement of androgen receptor activation and mitochondria-generated ROS.

Copyright © 2014 the American Physiological Society.

KEYWORDS:

ROS generation; apoptosis; mitochondria; testosterone

PMID: 24658017

DOI: [10.1152/ajpheart.00809.2013](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00809.2013)

[PubMed - indexed for MEDLINE]

The AMPK-related kinase SNARK regulates muscle mass and myocyte survival.

Lessard SJ, Rivas DA, So K, Koh HJ, Queiroz AL, Hirshman MF, Fielding RA, Goodyear LJ.

Abstract

The maintenance of skeletal muscle mass is critical for sustaining health; however, the mechanisms responsible for muscle loss with aging and chronic diseases, such as diabetes and obesity, are poorly understood. We found that expression of a member of the AMPK-related kinase family, the SNF1-AMPK-related kinase (SNARK, also known as NUAK2), increased with muscle cell differentiation. SNARK expression increased in skeletal muscles from young mice exposed to metabolic stress and in muscles from healthy older human subjects. The regulation of SNARK expression in muscle with differentiation and physiological stress suggests that SNARK may function in the maintenance of muscle mass. Consistent with this hypothesis, decreased endogenous SNARK expression (using siRNA) in cultured muscle cells resulted in increased apoptosis and decreased cell survival under conditions of metabolic stress. Likewise, muscle-specific transgenic animals expressing a SNARK dominant-negative inactive mutant (SDN) had increased myonuclear apoptosis and activation of apoptotic mediators in muscle. Moreover, animals expressing SDN had severe, age-accelerated muscle atrophy and increased adiposity, consistent with sarcopenic obesity. Reduced SNARK activity, in vivo and in vitro, caused downregulation of the Rho kinase signaling pathway, a key mediator of cell survival. These findings reveal a critical role for SNARK in myocyte survival and the maintenance of muscle mass with age.

PMID: 26690705

DOI: [10.1172/JCI79197](https://doi.org/10.1172/JCI79197)

[PubMed - indexed for MEDLINE]

Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and insulin resistance in rat skeletal muscle.

Teodoro BG¹, Baraldi FG, Sampaio IH, Bomfim LH, Queiroz AL, Passos MA, Carneiro EM, Alberici LC, Gomis R, Amaral FG, Cipolla-Neto J, Araújo MB, Lima T, Akira Uyemura S, Silveira LR, Vieira E.

Abstract

Melatonin has a number of beneficial metabolic actions and reduced levels of melatonin may contribute to type 2 diabetes. The present study investigated the metabolic pathways involved in the effects of melatonin on mitochondrial function and insulin resistance in rat skeletal muscle. The effect of melatonin was tested both in vitro in isolated rats skeletal muscle cells and in vivo using pinealectomized rats (PNX). Insulin resistance was induced in vitro by treating primary rat skeletal muscle cells with palmitic acid for 24 hr. Insulin-stimulated glucose uptake was reduced by palmitic acid followed by decreased phosphorylation of AKT which was prevented by melatonin. Palmitic acid reduced mitochondrial respiration, genes involved in mitochondrial biogenesis and the levels of tricarboxylic acid cycle intermediates whereas melatonin counteracted all these parameters in insulin-resistant cells. Melatonin treatment increases CAMKII and p-CREB but had no effect on p-AMPK. Silencing of CREB protein by siRNA reduced mitochondrial respiration mimicking the effect of palmitic acid and prevented melatonin-induced increase in p-AKT in palmitic acid-treated cells. PNX rats exhibited mild glucose intolerance, decreased energy expenditure and decreased p-AKT, mitochondrial respiration, and p-CREB and PGC-1 alpha levels in skeletal muscle which were restored by melatonin treatment in PNX rats. In summary, we showed that melatonin could prevent mitochondrial dysfunction and insulin resistance via activation of CREB-PGC-1 alpha pathway. Thus, the present work shows that melatonin play an important role in skeletal muscle mitochondrial function which could explain some of the beneficial effects of melatonin in insulin resistance states.

© 2014 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd.

KEYWORDS:

diabetes; insulin resistance; melatonin; mitochondrial function; skeletal muscle

PMID: 24981026

DOI: [10.1111/jpi.12157](https://doi.org/10.1111/jpi.12157)

[PubMed - indexed for MEDLINE]

Exercise therapy normalizes BDNF upregulation and glial hyperactivity in a mouse model of neuropathic pain.

Almeida C¹, DeMaman A, Kusuda R, Cadetti F, Ravanelli MI, Queiroz AL, Sousa TA, Zanon S, Silveira LR, Lucas G.

Abstract

Treatment of neuropathic pain is a clinical challenge likely because of the time-dependent changes in many neurotransmitter systems, growth factors, ionic channels, membrane receptors, transcription factors, and recruitment of different cell types. Conversely, an increasing number of reports have shown the ability of extended and regular physical exercise in alleviating neuropathic pain throughout a wide range of mechanisms. In this study, we investigate the effect of swim exercise on molecules associated with initiation and maintenance of nerve injury-induced neuropathic pain. BALB/c mice were submitted to partial ligation of the sciatic nerve followed by a 5-week aerobic exercise program. Physical training reversed mechanical hypersensitivity, which lasted for an additional 4 weeks after exercise interruption. Swim exercise normalized nerve injury-induced nerve growth factor, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) enhanced expression in the dorsal root ganglion, but had no effect on the glial-derived neurotrophic factor. However, only BDNF remained at low levels after exercise interruption. In addition, exercise training significantly reduced the phosphorylation status of PLC γ -1, but not CREB, in the spinal cord dorsal horn in response to nerve injury. Finally, prolonged swim exercise reversed astrocyte and microglia hyperactivity in the dorsal horn after nerve lesion, which remained normalized after training cessation. Together, these results demonstrate that exercise therapy induces long-lasting analgesia through various mechanisms associated with the onset and advanced stages of neuropathy. Moreover, the data support further studies to clarify whether appropriate exercise intensity, volume, and duration can also cause long-lasting pain relief in patients with neuropathic pain.

PMID: 25687543
[MEDLINE]

DOI: [10.1097/01.j.pain.0000460339.23976.12](https://doi.org/10.1097/01.j.pain.0000460339.23976.12)

[PubMed - indexed for

Long-Chain Acyl-CoA Synthetase 6 regulates lipid synthesis and mitochondrial oxidative capacity in human and rat skeletal muscle.

Teodoro BG^{1,2}, Sampaio IH¹, Bomfim LH³, Queiroz AL³, Silveira LR³, Souza AO¹, Fernandes AM⁴, Eberlin MN⁴, Huang TY⁵, Zheng D^{5,6}, Neufer PD^{7,6}, Cortright RN^{5,7,6}, Alberici LC⁸.

Abstract

Long-chain Acyl-CoA Synthetases (ACSL 1 to 6) are key enzymes regulating partitioning of acyl-CoA species toward different metabolic fates such as lipid synthesis or β -oxidation. Despite the understanding that ecotopic lipid accumulation in skeletal muscle is associated with metabolic diseases like obesity and Type II Diabetes, the role of specific ACSL isoforms in lipid synthesis remains unclear. Herein we describe for the first time the presence of ACSL6 mRNA in human skeletal muscle and the role that ACSL6 plays in lipid synthesis in both rodent and human skeletal muscle. ACSL6 mRNA was observed to be up-regulated by acute high fat meal ingestion in both rodents and humans. In rats, we also demonstrated that fasting and chronic aerobic training negatively modulated the ACSL6 mRNA and other genes of lipid synthesis. Similar results were obtained following ACSL6 knockdown in rat myotubes which was associated with a decreased accumulation of TAGs and lipid droplets. Under the same knockdown condition, we further document an increase in fatty acid content, phosphor-AMPK, mitochondrial content, mitochondrial respiratory rates, and palmitate oxidation. These results were associated with increased PGC-1 α , UCP2 and UCP3 mRNA and decreased reactive oxygen species production. In human myotubes ACSL6 overexpression reduced palmitate oxidation and PGC-1 α mRNA. In conclusion, ACSL6 drives acyl-CoA toward lipid synthesis and its downregulation improves mitochondrial biogenesis, respiratory capacity and lipid oxidation. These outcomes are associated with the activation of the AMPK/PGC1- α pathway. This article is protected by copyright. All rights reserved.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

PMID: 27647415

DOI: [10.1113/JP272962](https://doi.org/10.1113/JP272962)

[PubMed - as supplied by publisher]

Role of microRNAs on the Regulation of Mitochondrial Biogenesis and Insulin Signaling in Skeletal Muscle.

Lima TI^{1,2}, Araujo HN¹, Menezes ES¹, Sponton CH¹, Araújo MB¹, Bomfim LH¹, Queiroz AL², Passos MA², E Sousa TA³, Hirabara SM⁴, Martins AR⁵, Sampaio HC¹, Rodrigues A⁵, Curi R⁵, Carneiro EM¹, Boschero AC¹, Silveira LR⁶.

Abstract

Mitochondria play a critical role in several cellular processes and cellular homeostasis. Mitochondrion dysfunction has been correlated with numerous metabolic diseases such as obesity and type 2 diabetes. MicroRNAs are non-coding RNAs that have emerged as key regulators of cell metabolism. The microRNAs act as central regulators of metabolic gene networks by leading to the degradation of their target messenger RNA or repression of protein translation. In addition, vesicular and non-vesicular circulating miRNAs exhibit a potential role as mediators of the cross-talk between the skeletal muscle and other tissues/organs. In this review, we will focus on the emerging knowledge of miRNAs controlling mitochondrial function and insulin signaling in skeletal muscle cells. J. Cell. Physiol. 9999: 1-9, 2016. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

© 2016 Wiley Periodicals, Inc.

PMID: 27736004

DOI: [10.1002/jcp.25645](https://doi.org/10.1002/jcp.25645)

[PubMed - as supplied by publisher]