AILMA OLIVEIRA DA PAIXÃO

**Mecanismos moleculares associados à atrofia induzida por palmitato
em células C2C12.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Alice Cristina Rodrigues

Versão parcial

São Paulo

2018

RESUMO

PAIXÃO, A. O. **Mecanismos moleculares associados à atrofia induzida por palmitato em células C2C12**, 2018. 82f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O presente estudo tem como objetivo avaliar os mecanismos pelo qual o ácido palmítico induz atrofia muscular ou prejudica a regeneração em células C2C12. Para avaliar o efeito do AP na formação dos miotubos, células C2C12 foram diferenciadas e tratadas com ácido palmítico (AP: 0, 100 e 150 μ M) por 0-5 dias. Para indução *in vitro* de atrofia muscular os miotubos foram diferenciados por 5 dias e tratados com AP 100 μ M ou veículo por 48h. Nos mioblastos em proliferação foram realizados os ensaios de MTT, LDH, TUNEL e curvas de crescimento para avaliar o efeito do AP na citotoxicidade e proliferação celular e ensaio de cicatrização para avaliar se o AP prejudica a regeneração de mioblastos. Após 1 a 5 dias de diferenciação e tratamento com AP, as concentrações de 100 e 150 μ M induziram nas células C2C12 redução no diâmetro e tamanho das fibras tipo 1 e tipo 2 formados sem afetar a viabilidade celular ou induzir apoptose na linhagem C2C12 em comparação ao controle. Entretanto, o tratamento com AP induziu a formação de um maior número de fibras MyHC tipo 2 e menor do tipo 1. Enquanto o AP na concentração de 100 μ M não afeta a proliferação celular, na concentração de 150 μ M o AP parece prejudicar a proliferação, e após lesão, não há cicatrização completa mesmo 16 horas da lesão. A expressão de RNAm dos marcadores miogênicos (MyoD, Mstn, Myf5, MyH7 e miomesina) e dos microRNAs específicos de músculo esquelético também foram avaliadas em miotubos diferenciados e tratados ou não com AP (1 - 5 dias). Observou-se que um padrão temporal alterado de expressão dos marcadores miogênicos e dos miR-1, miR-133a e miR-206, que, provavelmente, ocorre para manter a diferenciação celular. Após 1 dia de diferenciação e tratamento com AP 100 e 150 μ M, observou-se um aumento na expressão de atrogin-1, possivelmente indicando uma maior degradação proteica. Já nas células diferenciadas por 5 dias e tratadas com AP por 48h, observamos redução do diâmetro dos miotubos, caracterizando o processo de atrofia, aumento no perfil de expressão dos miR-133a e 206 e não observamos alterações nas proteínas relacionadas a síntese e degradação proteica analisadas. Em conclusão, Concluímos que a atrofia muscular esteja sendo mediada pelos microRNAs alterados entretanto não é mediada pela via ubiquitina-proteassoma.

Palavras-chave: Obesidade; músculo esquelético; atrofia; microRNAs

ABSTRACT

PAIXÃO, A. O. **Molecular mechanisms associated with palmitate-induced atrophy in C2C12 cells**, 2018. 82f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The present study aims to evaluate the mechanisms by which palmitic acid induces atrophy or affects regeneration of C2C12 cells. The effect of AP (0, 100 and 150 μ M) on myotube formation of C2C12 cells were evaluated 0-5 days of differentiation. In order to induce muscular atrophy *in vitro*, myotubes were differentiated for 5 days and treated with AP 100 μ M or vehicle for 48h. In proliferating myoblasts MTT, LDH and TUNEL assays and cellular growth curves were performed in AP or vehicle-treated C2C12 cells so as to evaluate cytotoxicity and cell proliferation and the healing assay to analyze myoblasts regeneration. After 1 to 5 days of differentiation and treatment with AP, 100 and 150 μ M concentrations induced a reduction in the size and diameter of type 1 and 2 fibers formed without affecting cell viability or induce apoptosis in C2C12 cell line in comparison to the control. However, AP induced an increase in MyHC type 2 fibers whether reduced MyHC type 1 fibers. While 100 μ M AP did not affect cell proliferation, 150 μ M AP reduces C2C12 cellular proliferation, and after injury, the healing is not complete after 16h of the injury. mRNA expression of the myogenic markers (MyoD, Mstn, Myf5, MyH7 and miomesine) and of the muscle-specific microRNAs were evaluated in differentiated myotubes treated or not with AP (0-5 days). We observed an altered time pattern of expression of myogenic markers and of miR-1, miR-133a and miR-206, which probably occurs to maintain cell differentiation. After 1 day of differentiation and treatment with AP 100 and 150 μ M, it was observed an increased expression of atrogin-1, possibly indicating a greater protein degradation. After 5 days of differentiation and 48h-treatment with AP, we observed reduction of myotube diameter, characterizing the atrophy process, increased expression of miR-133a and 206, and no changes were observed in the proteins related to protein synthesis and degradation analyzed. In conclusion, AP reduces myotube differentiation inducing myotube atrophy by decreasing myogenic markers and accelerating protein degradation and promotes a change in type 1 and 2 fibers proportion. In myotubes, the mechanisms by wich AP induces myotube atrophy seems to involve an increase in miR-133a and miR-206 expression.

Keywords: Obesity; fatty acids; skeletal muscle; atrophy; microRNAs

1 INTRODUÇÃO

O caráter epidêmico que a obesidade adquiriu nas últimas décadas, vem levantando debates importantes, acerca dessa condição, devido à sua influência em diversas comorbidades encontradas na população (FINKELSTEIN *et al.*, 2012; FINUCANE *et al.*, 2011).

A obesidade é uma doença multifatorial e complexa que é definida como excesso de gordura no corpo (CONSTANTIN *et al.*, 2010; FAROOQUI 2011). Além da expansão de tecido adiposo, ocorre acúmulo ectópico de gordura em tecidos não-adiposos, como músculo esquelético.

O músculo esquelético é o tecido mais abundante do corpo humano, cada músculo é formado por um grande número de fibras em contração, essas fibras são altamente heterogêneas devido às suas diferentes características bioquímicas, fisiológicas e anatômicas; as mesmas são formadas pela fusão de inúmeros progenitores miogênicos (BIRESSI *et al.*, 2007).

A maior parte do músculo esquelético com exceção de alguns músculos craniofaciais deriva de progenitores presentes nos somitos. Somitos são estruturas segmentadas que se formam a partir do mesoderma paraxial, que se localizam em ambos os lados do tubo neural, cada somito se diferencia rapidamente em um esclerotômo ventral e um dermomiótomo dorsal (BIRESSI *et al.*, 2007; SILVA & CARVALHO 2007; SIEIRO-MOSTI *et al.*, 2014).

O tecido muscular esquelético é determinado em etapas que envolvem diferentes tipos celulares; mioblastos embrionários, mioblastos fetais e células satélites (**Figura 1**). Essas células são liberadas durante o desenvolvimento por células que expressam Pax3 e Pax7. Em uma dessas etapas, conhecida como miogênese primária, progenitores miogênicos (mioblastos embrionários) migram do dermomiótomo e começam a se diferenciar em fibras musculares multinucleadas; as fibras primárias. Durante essa fase, os músculos consistem em um pequeno número de miotubos que aumentam progressivamente de tamanho e adquirem uma forma redonda (BIRESSI *et al.*, 2007; LIEBER 2002).

Em um segundo estágio, os mioblastos fetais se fundem entre si, como também com fibras primárias, dando origem as fibras secundárias, essa fase é conhecida como miogênese secundária. Inicialmente, as fibras secundárias se formam no local de

inervação da fibra primária e são circundadas pela mesma lâmina basal. As fibras secundárias permanecem ligadas às fibras primárias e, posteriormente, essas fibras alongam-se e tornam-se fibras independentes, que podem ser diferenciadas das fibras primárias pelo seu tamanho relativamente pequeno (BIRESSI *et al.*, 2007; LIEBER 2002; SILVA & CARVALHO 2007).

Em adultos, a classificação das fibras musculares baseia-se na velocidade de contração que depende principalmente da atividade ATPásica da isoforma de miosina predominante. As fibras primárias e secundárias diferem na expressão das isoformas da cadeia pesada da miosina (MyHC). As fibras primárias expressam MyHC1 originando fibras com fenótipo predominantemente lento enquanto que as fibras secundárias expressam MyHC2 originando fibras com fenótipo de contração rápida (BIRESSI *et al.*, 2007; LIEBER 2002; SILVA & CARVALHO 2007).

Figura 1. Representação da linhagem do músculo esquelético.

O dermomiótomo dá origem as células que expressam Pax3 / Pax7, estas por sua vez, liberam precursores musculares durante o desenvolvimento (mioblastos embrionários, fetais e células satélites). Os mioblastos embrionários e fetais dão origem a fibras do tipo 1 e 2, respectivamente. As células satélites são identificadas no final da miogênese secundária, e são responsáveis pelo crescimento pós-natal e regeneração. Adaptado de (BIRESSI *et al.*, 2007).

É no final da miogênese secundária, que as células satélites podem ser identificadas morfológicamente. As células satélites são progenitores mononucleados que se localizam entre a lâmina basal e o sarcolema. Durante o desenvolvimento pós-natal estas células se dividem lentamente, uma parte da progênie se funde com fibras adjacentes contribuindo com novos núcleos para o crescimento das fibras, entretanto, no final do crescimento pós-

natal essas células entram em fase de quiescência. Em casos de lesões tecidual ou em resposta a novas demandas de crescimento, essas células são ativadas e sofrem inúmeras divisões celulares e fundem-se com as fibras danificadas participando assim da regeneração celular, ou formam novas células. Uma fração dessas células retornam à quiescência, mantendo assim o pool progenitor (BIRESSI *et al.*, 2007; SILVA & CARVALHO 2007).

Morfológicamente, o tecido muscular esquelético é constituído por feixes de células alongadas e multinucleadas, com 10 a 100 micrômetros de diâmetro e com variações no seu comprimento. As fibras musculares possuem numerosos núcleos que estão localizados na periferia da célula, abaixo da membrana plasmática e são ricas em filamentos proteicos, as chamadas miofibrilas, que conferem capacidade de contração ao músculo esquelético (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2013; LIEBER 202; SILVA & CARVALHO 2007).

No que se refere a sua organização, o tecido muscular esquelético possui três camadas de tecido conjuntivo; o epimísio que é a camada mais externa e recobre todo músculo por inteiro, o perimísio; que envolve o conjunto de feixes de fibras e o endomísio; camada mais interna que envolve individualmente cada fibra muscular (**Figura 2**). Essas camadas de tecido conjuntivo são de extrema importância para o músculo esquelético pois, são elas que mantem as fibras musculares unidas fazendo com que a contração consiga se propagar por todo músculo e outras estruturas como tendões e ossos (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2013; LIEBER 2002).

Figura 2. Organização do tecido muscular esquelético.

Ilustração de um tecido muscular adulto.

Fonte: [http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio210/chap09/lecture1.html\(5\)](http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio210/chap09/lecture1.html(5))

Em torno do endomísio, se encontram as inúmeras fibras musculares, cada fibra é composta por muitos feixes de filamentos, as miofibrilas, que estão dispostas paralelamente ao eixo da fibra muscular. Esses filamentos são compostos por proteínas contráteis e estruturais, tais como; troponina, tropomiosina, miosina, titina, nebulina, distrofina e principalmente pelas proteínas de actina (filamento fino) e miosina (filamento grosso) proteínas responsáveis pela contração e relaxamento do músculo esquelético (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2013; LIEBER 2002; SILVA & CARVALHO 2007).

Quando observado por microscopia óptica o músculo esquelético apresenta estriações transversais com alternâncias de camadas claras e escuras, essas estriações são resultado de repetições de unidades funcionais do músculo, os sarcômeros (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2013; LIEBER 2002; SILVA & CARVALHO 2007).

Cada sarcômero é composto pelas bandas A (faixas escuras/anisotrópica) e banda I (faixas claras/isotrópica). A banda A está localizada no centro do sarcômero e ainda nessa banda observa-se a zona H, uma região mais clara localizada no centro dessa banda. Nas extremidades do sarcômero estão localizadas as bandas I, uma em cada lado, e no meio da banda I observa-se a linha Z, que limita um sarcômero a outro. Da linha Z partem os filamentos finos de actina que estão dispostos até a extremidade da zona H, enquanto que os filamentos grossos de miosina ocupam a região central do sarcômero (banda A/zona H) (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2013; SILVA & CARVALHO 2007; SCHAPPACHER-T. G. *et al.*, 2015) (**Figura 3**).

Figura 3. Organização do sarcômero.
Adaptado de (FERREIRA *et al.*, 2011)

Para a contração e relaxamento do músculo, quatro proteínas possuem um papel fundamental, são elas; troponina, tropomiosina, actina e miosina (**Figura 4**). A troponina é uma proteína que é composta por três subunidades; a TnT, subunidade que interage com a tropomiosina, a TnC, subunidade que tem afinidade pelo cálcio e a TnI, subunidade responsável por cobrir o sítio ativo da actina, impossibilitando a ligação da actina com a miosina (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2013; LIEBER 2002).

A tropomiosina é uma molécula longa e fina que é constituída por duas cadeias polipeptídicas que se unem entre si pelas suas extremidades. A actina, principal proteína que forma os filamentos finos, é formada a partir da polimerização de monômeros globulares, quando esses monômeros globulares se polimerizam, formam duas cadeias que são torcidas uma sobre a outra dando origem a actina que se apresenta em forma de polímeros longos (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2013; LIEBER 2002).

Já a miosina é uma molécula que se apresenta em forma de bastão, em uma de suas extremidades é possível observar uma saliência globular; (cabeça da miosina) é nessa região onde se localiza os locais específicos para a combinação com a molécula de ATP e consequentemente a liberação de energia responsável pela contração muscular (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2013; LIEBER 2002).

Figura 4. Sistema actina/miosina.

Fonte: Adaptado de (SERVIER Medical Art).

No momento da contração muscular, os íons de cálcio que estão armazenados no retículo sarcoplasmático são liberados no sarcoplasma, esses íons são captados pela subunidade C da troponina (TnC), no momento em que esses íons interagem com essa subunidade, ocorre uma alteração na conformação das três subunidades de troponina, dessa forma, a subunidade TnT da troponina que estava ligada a tropomiosina no sítio ativo da actina é deslocada, liberando esse sítio de ligação, dessa forma, ocorre a interação da actina com as cabeças da miosina. Em consequência a essa ligação, o ATP que estava

ligado na cabeça da miosina é liberado dando origem a ADP + P (fosfato) e energia. O movimento da cabeça da miosina empurra a actina, promovendo o deslizamento dos filamentos uns sobre os outros (actina/miosina) (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2013; LIEBER 2002).

O músculo esquelético constitui cerca de 40% do total do peso corpóreo e é responsável por cerca de 80% da utilização da glicose pós-prandial estimulada pela insulina (OLEFSKY & NOLA 1995). A insulina é um hormônio sintetizado e secretado pelas células β -pancreáticas, essencial na homeostase do corpo, estando envolvido com diversas funções metabólicas e importantes processos biológicos como síntese do DNA, *turnover* proteico, crescimento, proliferação e diferenciação celular (CARVALHEIRA *et al.*, 2002; COLETTA *et al.*, 2008; FELIX 2012). Em situações fisiológicas normais as células incluindo o músculo esquelético utilizam a glicose inibindo a oxidação de ácidos graxos, entretanto, em situações de resistência à insulina (RI) em que há privação de glicose, a oxidação de ácidos graxos é ativada (SABOURIN *et al.*, 1999). O comprometimento da utilização da glicose e a sensibilidade à insulina no tecido muscular têm sido relacionados à presença de altas quantidades de ácidos graxos livres no plasma (LI *et al.*, 2011).

O acúmulo de ácidos graxos e/ou de seus derivados podem induzir resistência à insulina no músculo esquelético, como também ser a razão para o declínio da massa muscular na obesidade. A morfologia do músculo, tamanho e função também podem ser alteradas devido à alta captação e armazenamento de ácidos graxos (SU *et al.*, 2015; UMEGAKI 2015).

Na teoria de lipotoxicidade, os ácidos graxos são armazenados no músculo para servir de fonte de energia em situações necessárias, como no exercício físico. Entretanto, após algumas horas, esse acúmulo de lipídeos (triglicerídeos) tornam-se tóxicos e diminui a secreção de insulina (JANSSON *et al.*, 1994). Além disso, estudos (CARVALHEIRA *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2010) apontam, que o acúmulo de metabólitos de lipídicos intermediários tais como diacilglicerol (DAG), triacilglicerol (TG), ceramida (CR), entre outros, interferem na ação da insulina devido a ativação de diferentes serinas quinases envolvidas na regulação negativa da insulina.

O acúmulo de DAG no músculo esquelético de indivíduos obesos e diabéticos está relacionado com o aumento na atividade de PKC- θ , pela via de fosforilação da serina dos IRS-1, e que este metabólito lipídico dá início ao estado de RI. A ceramida também inibe

a via de sinalização da insulina, através da inibição da fosforilação da AKT (CARVALHEIRA *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2010).

1.1 Atrofia muscular

A atrofia muscular é caracterizada por uma diminuição no tamanho das fibras musculares pré-existentes e da massa muscular. A massa muscular é mantida pelo equilíbrio entre a síntese e degradação proteica, um desequilíbrio nesse balanço contribui para a perda de proteínas musculares (LAGIRAND-CANTALOUBE *et al.*, 2008).

A atrofia é observada em processos fisiológicos e patológicos. Em processos fisiológicos (envelhecimento) é observado redução de fibras musculares, principalmente do tipo II, no músculo de idosos as fibras são gradualmente substituídas por adipócitos e tecido conjuntivo. Os lipídeos intramiocelulares estão associados à disfunção mitocondrial, a qual é um fator essencial na patogênese da sarcopenia (REZNICK *et al.*, 2007). As consequências da sarcopenia tem um importante significado clínico, pois além de contribuir para uma fragilidade física geral devido à redução na força, ainda ocasiona uma diminuição na expectativa de vida. (SANDRI *et al.*, 2004; SU *et al.*, 2015).

Uma progressiva perda de músculo esquelético é observada em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) com controle glicêmico inadequado e em idosos com DM2 (JAKOBSEN & RESKE-NIELSEN 1986; KIM *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2009; UMEGAKI, 2015). A redução de massa muscular encontrada em pacientes diabéticos ocorre muito provavelmente devido ao fato da insulina atuar promovendo a síntese de proteínas, e, portanto, na RI a síntese dessas proteínas é diminuída e sua degradação aumentada, consequentemente reduzindo a massa muscular (atrofia) e sua função (fraqueza muscular) (SU *et al.*, 2015; UMEGAKI 2015). O tratamento com insulina (SALA & ZORZANO 2015) ou com sensibilizadores de insulina atenuam a progressão ou previnem a sarcopenia (UMEGAKI 2015).

Em músculo de modelos de obesidade genética como o camundongo db/db, a degradação proteica e a atividade dos dois principais sistemas proteolíticos estão aumentadas devido à supressão da via IRS-1/PI3K/AKT, aumento de glicocorticóides plasmáticos e baixas concentrações de adiponectina. O tratamento com o sensibilizador de insulina, rosiglitazona, reverteu a perda de massa muscular e restaurou a via PI3K/AKT (WANG *et al.*, 2006). Do mesmo modo, em modelos experimentais de diabetes tipo 1, o aumento da proteólise muscular foi causado por uma menor atividade

da PI3K, a qual reduz a fosforilação da AKT que indiretamente aumentam a expressão das enzimas E3- ligases (MuRF1 e MAFbx/atrogin-1), levando, portanto, a perda de massa muscular (DU *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004).

As células de mamíferos, possuem vários sistemas proteolíticos para regular este processo de degradação, dentre elas duas vias são destacadas; a via lisossomal, e a via da ubiquitina-proteassoma.

A via lisossomal está presente em praticamente todas as células estando envolvida principalmente na degradação de proteínas de membrana de superfície, proteínas extracelulares endocíticas e glicoproteínas. O lisossomo contém várias proteases que são ativas no pH ácido dessas organelas como as catepsinas B, H e D. Este processo de degradação é acelerado na maioria das células pela falta de insulina ou aminoácidos essenciais, e no fígado pelo glucagon (BECHET *et al.*, 2005; LECKER *et al.*, 1999).

Já a via ubiquitina-proteassoma foi demonstrada inicialmente na década de 1970, esta via desempenha um importante papel na degradação de proteínas, visto que, a maior parte de todas as proteínas intracelulares são degradadas por esta via. A mesma também possui um papel especial na degradação acelerada de proteínas miofibrilares tanto em jejum como em estados de doença (HERSHKO & CIECHANOVER 1998; LECKER *et al.*, 1999).

Para que haja ativação da via, primeiramente a ubiquitina; um polipeptídeo de 76 aminoácidos deve ser ativado em seu resíduo de glicina C-terminal. Para que isso aconteça é necessário a ação da primeira enzima envolvida no processo de ubiquitinação, a enzima E1 (enzima ativadora de ubiquitina), esta enzima utiliza ATP para gerar uma forma altamente reativa de ubiquitina, a hidrólise de ATP conduz a liberação de AMP. Esta forma de alta energia da ubiquitina é essencial para a eventual ligação a proteína substrato. Uma vez ativada, a ubiquitina ligada a enzima E1 é transferida para proteínas carreadoras de ubiquitina (E2). A grande quantidade de enzimas E2 ajuda a gerar a especificidade do sistema de ubiquitinação, uma vez que determinadas enzimas E2 atuam na degradação de diferentes tipos de substratos (HERSHKO & CIECHANOVER 1998; LECKER *et al.*, 1999).

Por fim, a enzima E3 (enzima ubiquitina-ligase) seleciona a proteína que está marcada e segue para a degradação no proteassoma. A proteína é marcada devido a ligação de várias ubiquitinas ligadas formando cadeias multi-Ub, na proteína alvo (HERSHKO & CIECHANOVER 1998; LECKER *et al.*, 1999).

A proteólise é então catalisada pelo complexo proteassoma 26S. Esse complexo dividido no proteossoma 20s e em uma partícula reguladora de 19S que fica localizada em cada extremidade do proteassoma 20S, degrada as proteínas em pequenos peptídeos. O proteossoma 20s é uma estrutura em forma de barril de quatro anéis empilhados, os dois anéis internos envolvem uma câmara central onde a proteína é degradada, enquanto os dois anéis externos circundam uma pequena abertura através da qual os substratos protéicos devem entrar. A partícula reguladora 19s fornece especificidade à proteólise e catalisa a entrada do alvo no proteossoma 20S (HERSHKO & CIECHANOVER 1998; LECKER *et al.*, 1999).

1.2 Fatores transcrpcionais reguladores da miogênese

O desenvolvimento do músculo esquelético é um processo que envolve proliferação, diferenciação, migração e morte celular (TOWNLEY-TILSON *et al.*, 2010), o mesmo é regulado por fatores regulatórios miogênicos (MRFs) os quais incluem *Myogenic differentiation 1* (MyoD), *Miogenina* (MyoG), *Myogenic factor 5* (MyF5) e *Myogenic factor 6* (Myf6 ou MRF4). Os MRFs em conjunto com proteínas da família *Myocyteenhancer factor 2* (MEF2) regulam atividades de co-ativadores e co-repressores durante a miogênese (DEDIEU *et al.*, 2002; BERKES *et al.*, 2005; ROSENBERG *et al.*, 2006).

A fusão de mioblastos é essencial para a diferenciação muscular, gerando fibras musculares multinucleadas a partir de mioblastos mononucleados. Em cultura, os mioblastos proliferam, então migram e se alinham para a fusão. (HOLTZER *et al.*, 1958; KALDERON & GILULA 1979).

DEDIEU e cols. (2002) estudaram o processo de diferenciação de miotubos a partir de mioblastos da linhagem celular C2C12. Em meio de diferenciação, as células C2C12 começam a se fundir a partir do segundo dia. Eles observaram a expressão dos MRFs durante a fusão e diferenciação dos miotubos. Enquanto MyoD, miogenina e MyF5 estavam presentes durante o processo de fusão dos mioblastos, o MRF4 foi indetectável até os dez primeiros dias de diferenciação. Ainda durante o processo eles perceberam que MyoD exibiu um estado estacionário, a partir do segundo dia, enquanto que a expressão de MyF5 aumentou até o quarto dia, e posteriormente sua expressão foi diminuída e se apresentou estacionária. Já a miogenina aumenta progressivamente a partir do segundo

dia até por volta do sexto dia, quando a fusão cessa e começa a cair progressivamente até o décimo dia, último dia observado. Utilizando oligonucleotídeos antisense contra esses MRFs no processo de fusão e diferenciação em linhagem C2C12, demonstrou que a inibição de qualquer um desses fatores miogênicos é capaz de prevenir ou diminuir o processo de fusão, prejudicando a formação de miotubos.

Além dos MRFs, um membro da família dos fatores de crescimento tumoral β (TGF- β), a miostatina (Mstn) é de extrema relevância na regulação do crescimento muscular. A Mstn se liga ao receptor activina tipo II (ActRII) localizado na membrana plasmática. O ActRII associa-se ao seu correspondente receptor de activina tipo I (ActRI) formando um complexo receptor heterotetramérico ativado, o qual trans-fosforila o ActRII ativando a kinase latente deste complexo. O complexo do receptor ativado fosforila as proteínas Smad2 e Smad3 que se unem a co-smad denominada Smad4. O oligômero de Smads transloca-se para o núcleo da célula onde interage com fatores transcricionais tais como os MRFs; diminuindo a ativação e proliferação celular e com os genes de degradação Murf1 e atrogin-1 aumentando a degradação proteica. A via da Mstn ativada acarreta na inibição da via PI3K/AKT responsável pela síntese proteica (ELKINA *et al.*, 2011; SILVA 2014) (**Figura 5**).

1.3 Vias de síntese e degradação proteica

Vários estímulos extracelulares e distintas vias de sinalização podem modular a expressão desses fatores miogênicos. No entanto, no que se refere a proliferação, crescimento e diferenciação do músculo esquelético, a via de sinalização envolvida é a do fator de crescimento similar a insulina (IGF-1), a via IGF1-R/PI3K/AKT/MTOR. A sinalização celular promovida por IGF1 e IGF-2 é mediada pelo receptor de IGF-1, um receptor de tirosina quinase. Após ligação ao receptor o mesmo se autofosforila e induz a ativação da PI3K/AKT, AKT fosforilada ativa mTOR; que é responsável pela síntese proteica e inativa FoXO3 que está fosforilada e retida no citoplasma, dessa forma, inibe a degradação proteica, uma vez que a FoXO3 não consegue ir para o núcleo ativar os atrogenes (atrogin 1/MuRF1), promovendo a síntese proteica e inibindo a degradação (ROMMEL *et al.*, 2001; SANDRI *et al.*, 2004; BODINE *et al.*, 2001) (**Figura 5**). Portanto, a diminuição da sinalização por IGF-1 leva ao aumento da degradação proteica. A superexpressão de IGF1 ou de AKT em músculo esquelético é suficiente para reduzir

perda muscular, induzir hipertrofia e aumentar força (SACHECK *et al.*, 2004; LAI *et al.*, 2004).

A participação da sinalização por IGF1-R na via de sinalização da insulina foi demonstrada em camundongos geneticamente modificados que expressam Igf-1R mutante. Esses indivíduos são diabéticos e apresentam resistência à insulina no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo, todos alvos primários da ação da insulina (FERNANDEZ *et al.*, 2001).

No que se refere à degradação proteica, uma via em particular é de extrema importância; a via proteolítica da ubiquitina-proteassoma dependente de ATP (LATRES *et al.*, 2005). Durante a atrofia, há um aumento nos conjugados de ubiquitina-proteína (LATRES *et al.*, 2005). A ubiquitina é um pequeno peptídeo que pode ser conjugado com substratos protéicos específicos, uma cadeia de poliubiquitina é construída e esta cadeia é alvo do substrato para uma estrutura chamada proteassoma, onde o substrato é lisado em pequenos peptídeos (GLASS 2003).

O aumento da transcrição dos genes MAFBx/atrogin-1 e Murf1, componentes envolvidos na via de degradação da ubiquitina, é essencial na perda de proteínas musculares, pois estes codificam as proteínas ligases que atuam para conjugar a ubiquitina em substratos de proteínas, assim sendo consideradas marcadores no processo de atrofia muscular (LATRES *et al.*, 2005).

BODINE e cols. (2001) mostraram que camundongos com deficiência em MAFBx/Atrogin-1 são resistentes a atrofia por desnervação do músculo esquelético e SACHECK e cols. (2004) apontam que esse gene é essencial para a perda de proteínas em modelos experimentais incluindo o diabetes.

No músculo esquelético, o sistema ubiquitina-proteassoma, é regulado por fatores de transcrição da família *forkhead* e subfamília O (FoxO) que é regulado pela proteína quinase B (PKB/Akt). A FoxO foi relatada com um regulador da transcrição de MAFBx em resposta ao estresse celular e atuando na atrofia muscular (LAGIRAND-CANTALOUBE *et al.*, 2008). A AKT regula negativamente os fatores de transcrição FoxO que por sua vez induz a ativação de MAFBx/atrogin-1 e MuRF1 (**Figura 5**).

Figura 5. Via de sinalização da insulina e IGF-1.

A insulina ou IGF-1 ativa seu receptor que se autofosforila e ativa PI3K/AKT/mTOR que se associa a raptor e GβL formando o complexo mTORC1 que ativa S6K induzindo o aumento da síntese proteica. A redução dessa via resulta em inibição da mTOR e síntese proteica. Enquanto que o aumento na expressão da Miostatina além de inativar a via PI3K, induz a formação de um complexo que fosforila as proteínas Smad2, Smad3 que se unem a Smad4. Esse conjunto de Smads translocam-se para o núcleo da célula onde interagem com fatores que regulam a transcrição (atrogina-1 e Murf1) culminando no aumento da degradação proteica. IGF-1, fator de crescimento similar à insulina 1; FOXO, *forkhead box protein O*; MURF-1, *muscle-specific RING-finger 1*. Modificado de (SILA 2014).

Além da miogênese ser regulada pelos fatores transcricionais, os microRNAs também desempenham uma importante função no desenvolvimento do músculo esquelético.

1.4 MicroRNAs

Os miRNAs foram inicialmente descritos por LEE e cols. (1993) enquanto estudavam o desenvolvimento larval do nematódeo *Caenorhabditis elegans*, onde verificaram que uma pequena molécula de RNA (lin-4) era responsável pela regulação negativa da expressão da proteína lin-14, essencial ao primeiro estágio larval do nematódeo.

Esses pequenos RNAs (miRNAs) de aproximadamente 22 nucleotídeos, desempenham um importante papel na regulação pós-transcricional da expressão gênica através da ligação na região 3' UTR (Região não traduzida 3') de mRNAs alvos, degradando-os ou impedindo a sua tradução (KIM *et al.*, 2002; ELGHEZNAWY *et al.*, 2015).

Os miRNAs estão envolvidos na regulação de diversos processos celulares e alterações na sua expressão são observadas em diversas patologias. Em mamíferos, os miRNAs podem regular aproximadamente 30% de todos os genes codificadores de proteínas (KIM & NAM, 2006).

A localização genômica dos genes dos miRNAs é variada. Nos seres humanos eles encontram-se distribuídos em todos os cromossomos exceto no cromossomo Y, e podem se apresentar das seguintes formas: intergênicos, intrônicos ou exônicos, sendo que os miRNAs intergênicos e intrônicos podem formar clusters ou não (KIM & NAM, 2006; OLENA & PATTON, 2010). A formação de clusters geralmente envolve miRNAs relacionados, possuindo sequências quase idênticas, embora isso nem sempre seja uma regra, e o fato de os miRNAs poderem ser originados de uma região intergênica faz com que possam ter promotores específicos (LAU *et al.*, 2001) ou serem transcritos a partir dos promotores de seus genes hospedeiros. Supõe-se que os miRNAs agrupados almejem o mesmo gene ou diferentes genes na mesma via (KIM & NAM, 2006).

Os genes de miRNAs são transcritos a miRNAs primários (pri-miRNAs) mais frequentemente pela Polimerase II, os quais contêm 7-metilguanosina (m7G cap) na extremidade 5' e uma cauda poli-A na extremidade 3'. Esses pri-miRNAs possuem uma estrutura em grampo que é clivada ainda no núcleo da célula, pela enzima Drosha em complexo com a proteína DGCR8, formando o pré-miRNA (miRNA precursor), de aproximadamente 70nt de comprimento. Com isso, o pré-miRNA é reconhecido pela exportina 5, um fator de transporte nuclear, a qual transporta o pré-miRNA do núcleo para o citoplasma. Nesse local, o pré-miRNA sofre ação da enzima Dicer, transformando-se em um duplex de miRNA. Geralmente, a fita do duplex com maior instabilidade na região 5' será adicionada ao complexo RISC (Complexo de Inativação Induzido por RNA), formando, assim, o miRNA maduro de aproximadamente 22nt de comprimento, sendo a outra fita degradada (KIM & NAM, 2006) (**Figura 6**).

Figura 6. Biogênese dos microRNAs.

FONTE: (CHELOUFI *et al.*, 2010)

Após a sua adição ao complexo RISC, o miRNA maduro, em várias cópias, exercerá sua função de regulador da expressão gênica através da degradação do RNAm alvo ou através do impedimento da sua tradução. Esse segundo mecanismo parece ser o mais característico em animais. Na maioria dos casos, o pareamento miRNA-RNAm é imperfeito. Porém, o mais importante para a função do miRNA é que haja um pareamento perfeito de seus nucleotídeos da região *seed* com a região 3'UTR (Região não traduzida 3') da molécula de RNAm (FILIPOWICZ *et al.*, 2008) (**Figura 7**).

Figura 7. Esquema demonstrando a ligação do miRNA maduro ao RNAm alvo.

Em vermelho pode-se observar a região *seed* do miRNA e suas bases complementares em verde no RNAm alvo. Em rosa são destacadas algumas bases entre as posições 13-16 do miRNA, as quais ajudam a manter a estabilidade da ligação e, de preferência, também devem ser complementares ao RNAm alvo. A região em arco (Bulge) também contribui na função dos miRNAs pois impede a ação da enzima Argonata 2, que faz parte do complexo RISC, a qual tem atividade de endonuclease, podendo clivar o RNAm. Bulge, Arco; Complementarity, Complementariedade; Nucleotides, Nucleotídeos; ORF, Open Reading Frame; Seed Region, Região Seed. FONTE: adaptado de (Filipowicz *et al.*, 2008).

1.5 MiomirRs

Em especial os microRNAs miR-1a, miR-133 e miR-206 são expressos especificamente em músculo na forma de clusters. Em camundongos, os clusters miR-1a-1/miR-133a-2 estão localizados no cromossomo 2, o miR-1a-2/miR-133a-1 no cromossomo 18 e o cluster miR-206/miR-133b no cromossomo 1 (GOLJANEK-WHYSALL *et al.*, 2012), este último cluster é predominantemente expresso em músculos com alto teor de miofibras do tipo I oxidativas.

As funções desses miomirRs no processo de miogênese são reconhecidas e bem estabelecidas, atuando durante o desenvolvimento inicial de miócitos até a manutenção do músculo esquelético. Enquanto que o miR-1 e 133 são encontrados nos músculos esquelético e cardíaco, o miR-206 é específico para o músculo esquelético (TOWNLEY-TILSON *et al.*, 2010).

Os microRNAs miR-1, 133 e 206 são especificamente induzidos durante a miogênese, os miR-1 e -206 estão intimamente relacionados no que se refere a expressão e função. O miR-1a e miR-206 promovem a diferenciação do mioblasto pela repressão pós-transcricional da HDAC4 e da subunidade p180 da DNA polimerase alfa, respectivamente (CHEN *et al.*, 2006, CHEN *et al.* 2010; HAK *et al.*, 2006). Por outro lado, o miR-133a promove a proliferação pela repressão de fatores de resposta a soro (SRFs) em células C2C12 (CHEN *et al.*, 2006). Acredita-se que o miR-1 e -133 sejam expressos precocemente no desenvolvimento embrionário atuando em atividades proliferativas e apoptóticas, porém com funções opostas no decorrer do desenvolvimento embrionário.

A inibição endógena de miR-1 e miR-206 de células em diferenciação utilizando anti-miRs bloqueia a diminuição da expressão da maioria dos genes envolvidos na diferenciação, indicando que a interação microRNA – RNA alvo é essencial para esse processo (GOLJANEK-WHYSALL *et al.*, 2012). Assim, os miRs-1 e -206 estão intimamente relacionados com a diferenciação de mioblastos, e o miR-133 promove a proliferação de mioblastos e inibe a diferenciação.

Utilizando células C2C12 demonstrou-se que o Igf-1R é alvo do miR-133 que regula negativamente a via de sinalização do Igf-1. Além disso, a presença extracelular de Igf-1 aumenta a expressão de miR-133 durante a diferenciação celular via aumento de miogenina (HUANG *et al.*, 2011).

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa (FRIAS *et al.*, 2016), identificou que os microRNAs miR-1, 133a e 206 músculo-específico possuem expressão diminuída em camundongos C57BL/6 com RI induzida por dieta hiperlipídica quando comparado aos animais controle e que por sua vez esses animais apresentaram um aumento da expressão de genes e proteínas relacionadas com a biogênese e função mitocondrial.

Considerando que há diminuição dos miRNAs no músculo esquelético de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica e que esses mesmos microRNAs participam da miogênese através do controle da via de sinalização IGF1/PI3K/AKT/MTOR, acreditamos que esses microRNAs devem estar envolvidos com a perda de massa muscular associada ao diabetes.

De fato, utilizando um modelo de perda muscular induzido por diabetes tipo 1, SU e cols. (2015) mostraram que o tratamento com acupuntura associado a estimulação elétrica de baixa frequência (Acu-LFES) diminui a perda muscular, promovendo a regeneração muscular, a qual foi alcançada tanto regulando positivamente a via de sinalização do IGF-1, bem como aumentando a expressão dos microRNAs miR-1a e miR-206. Já em relação ao diabetes tipo 2, resultados do nosso grupo mostram diminuição da expressão do miR-1 e aumento do miR-133a em músculos de camundongos obesos após 12 semanas de dieta hiperlipídica, a qual foi relacionada a menor miogênese e perda de massa muscular (FRIAS *et al.*, 2016).

O aumento de ácido graxos circulantes está associado com várias doenças crônicas (ABDELMAGID *et al.*, 2015). Em soro de animais alimentados com dieta balanceada os níveis de ácido palmítico é de $0,099 \pm 0,038\text{g}/100\text{mL}$, enquanto que em animais alimentados com dieta hiperlipídica esses níveis são de $0,104 \pm 0,006\text{g}/100\text{mL}$ (MAIS *et*

al., 2014). ABDELMADIG e cols. (2015) determinaram concentrações de ácidos graxos dos lipídios totais plasmáticos de indivíduos saudáveis e a concentração de ácido palmítico foi em média 1631,1µmol/L. Essa concentração se correlacionou positivamente com o colesterol da LDL, triglicerídeos e colesterol total.

A quantidade elevada de lipídeos na dieta, contendo principalmente AG saturados e poliinsaturados ômega-6, leva ao desenvolvimento da obesidade e consequentemente resistência à insulina (ASTRUP *et al.*, 2000; WEST&YORK, 1998). Sendo o ácido palmítico o ácido graxo mais prevalente no músculo esquelético (CHAVEZ & SUMMERS 2003), é imperativo explorarmos o efeito desse ácido graxo na diferenciação de mioblastos, visto que tanto obesos como diabéticos idosos evoluem mais rápido para sarcopenia (BRYNER *et al.*, 2012) e a causa primária poderia ser uma reduzida síntese proteica em resposta a estímulo hormonal ou de nutrientes.

Nossos achados podem contribuir para elucidação dos mecanismos inerentes da atrofia induzida pela obesidade.

2. CONCLUSÕES

Nossos resultados mostram que conseguimos induzir atrofia com o ácido palmítico (100µM e 150µM) em células em diferenciação (1º ao 5º dia) como também em células já diferenciadas (100µM). Observamos uma alteração de expressão dos marcadores miogênicos MyoD, Mstn, Myf5, MyH7 e miomesina e dos microRNAs miR-1, miR-133a e miR-206, que, provavelmente, ocorre para manter a diferenciação celular. Adicionalmente, mostramos que o AP afeta a regeneração muscular.

Nas células diferenciadas e tratadas por 48h, observamos aumento na expressão dos miRs -133a e -206 porém não observamos alterações na via de sinalização em estudo. Concluimos que a atrofia muscular esteja sendo mediada pelos microRNAs alterados entretanto não é mediada pela via ubiquitina-proteassoma.

REFERÊNCIAS*

- ABDELMAGID, S. A., CLARKE, S. E., NIELSEN, D. E., BADAWI, A., EL-SOHEMY, A., MUTCH, D. M., MA, D. W. Comprehensive profiling of plasma fatty acid concentrations in young healthy Canadian adults. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0116195, 2015.
- ASTRUP, A., RYAN, L., GRUNWALD, G. K., STORGAARD, M., SARIS, W., MELANSON, E., HILL, J. O. The role of dietary fat in body fatness: evidence from a preliminary meta-analysis of ad libitum low-fat dietary intervention studies. **british journal of nutrition**, v. 83, n. s1, p. s25-s32, 2000.
- BECHET, D., TASSA, A., TAILLANDIER, D., COMBARET, L., ATTAIX, D. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 10, p. 2098-2114, 2005.
- BERKES, C. A.; TAPSCOTT, S. J. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2005. p. 585-595.
- BERRIDGE, M. V., TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474-482, 1993.
- BIRESSI, S., MOLINARO, M., COSSU, G. Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. **Developmental biology**, v. 308, n. 2, p. 281-293, 2007.
- BODINE, S. C. et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nature cell biology**, v. 3, n. 11, p. 1014-1019, 2001.
- BODINE, S. C.; BAEHR, L. M. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 307, n. 6, p. E469-E484, 2014.
- BRYNER, R. W. et al. Docosahexaenoic Acid Protects Muscle Cells from Palmitate-Induced Atrophy. **ISRN Obesity**, v. 2012, p. 1-14, 2012.
- CARVALHEIRA, J. B.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J; Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.
- CHAVEZ, J. A.; SUMMERS, S. A. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 419, n. 2, p. 101-109, 2003.
- CHAVEZ, J. A. et al. A Acid ceramidase overexpression prevents the inhibitory effects of saturated fatty acids on insulin signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 20, p. 20148-20153, 2005.
- CHELOUFI, S. et al. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. **Nature**, v. 465, n. 7298, p. 584-589, 2010.

CHEN, J.-F. et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. **Nature Genetics**, v. 38, n. 2, p. 228–233, 25 fev. 2006.

CHEN, Y., MCMILLAN-WARD, E., KONG, J., ISRAELS, S. J., GIBSON, S. B. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. **Cell death and differentiation**, v. 15, n. 1, p. 171, 2008.

CHEN, X., WANG, K., CHEN, J., GUO, J., YIN, Y., CAI, X., ZHANG, Y. In vitro evidence suggests that miR-133a-mediated regulation of uncoupling protein 2 (UCP2) is an indispensable step in myogenic differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 8, p. 5362-5369, 2009.

CHEN, J. et al. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. **The Journal of cell biology**, v. 190, n. 5, p. 867-879, 2010.

COLETTA, D. K. et al. Effect of acute physiological hyperinsulinemia on gene expression in human skeletal muscle in vivo. **American Journal of PhysiologyEndocrinology and Metabolism**, v. 294, n. 5, p. E910-E917, 2008.

COQUILLARD, C., VILCHEZ, V., MARTI, F., GEDALY, R. mTOR signaling in regulatory T cell differentiation and expansion. **SOJ Immunol**, v. 3, n. 1, p. 1, 2015.

CONSTANTIN, A. et al. Leptin G-2548A and leptin receptor Q223R gene polymorphisms are not associated with obesity in Romanian subjects. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 391, n. 1, p. 282-286, 2010.

DANDO, I., FIORINI, C., DALLA P. E., PADRONI, C., COSTANZO, C., PALMIERI, M., DONADELLI, M. UCP2 inhibition triggers ROS-dependent nuclear translocation of GAPDH and autophagic cell death in pancreatic adenocarcinoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 3, p. 672-679, 2013.

DEDIEU, S. et al. Involvement of myogenic regulator factors during fusion in the cell line C2C12. **International Journal of Developmental Biology**, v. 46, n. 2, p. 235-241, 2002.

DU, J. et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. **The Journal of clinical investigation**, v. 113, n. 1, p. 115-123, 2004.

ELGHEZNAWY, A. et al. Dicer Cleavage by Calpain Determines Platelet microRNA Levels and Function in Diabetes. **Circulation research**, v. 114, p. 305-784, 2015.

ELKINA, Y. et al. The role of myostatin in muscle wasting: an overview. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**, v. 2, n. 3, p. 143-151, 2011.

FAROOQI, I. S. Genetic, molecular and physiological insights into human obesity. **European journal of clinical investigation**, v. 41, n. 4, p. 451-455, 2011.

FAYZULLINA, S., MARTIN, L. J. Detection and analysis of DNA damage in mouse skeletal muscle in situ using the TUNEL method. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 94, 2014.

FELIX, J. Estudo das vias intracelulares de sinalização da insulina e da angiotensina-II no hipotálamo de ratas grávidas e lactantes. 2012. 115 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012.

FERNANDEZ, A. M. et al. Functional inactivation of the IGF-I and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes. **Genes & development**, v. 15, n. 15, p. 1926-1934, 2001.

FERREIRA, R. C., CARVALHO, R. F., PIRES, I. F., MOREIRA, A. L. Papel da titina na modulação da função cardíaca e suas implicações fisiopatológicas. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 96, p. 332-339, 2011.

FILIPOWICZ, W., BHATTACHARYYA, S. N., SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. **Nature reviews genetics**, v. 9, n. 2, p. 102, 2008.

FINKELSTEIN, E. A. et al. Obesity and severe obesity forecasts through 2030. **American journal of preventive medicine**, v. 42, n. 6, p. 563-570, 2012.

FINUCANE, M. M. et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9·1 million participants. **The Lancet**, v. 377, n. 9765, p. 557-567, 2011.

FOLETTA, V. C., WHITE, L. J., LARSEN, A. E., LÉGER, B., RUSSELL, A. P. The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 461, n. 3, p. 325-335, 2011.

FOTAKIS, G., TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

FRIAS, F. T. Papel dos microRNAs (miR-1, miR-133, miR-206, miR-208b, miR-499 e miR-223) no músculo esquelético de camundongos C57BL/6 durante o estado de resistência à insulina. 2016. 80 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2016.

GANLEY, I. G., LAM, D. H., WANG, J., DING, X., CHEN, S., JIANG, X. ULK1·ATG13·FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 18, p. 12297-12305, 2009.

GLASS, D. J. Molecular mechanisms modulating muscle mass. **Trends in molecular medicine**, v. 9, n. 8, p. 344-350, 2003.

GOLJANEK-WHYSALL, K. et al. Regulation of multiple target genes by miR-1 and miR-206 is pivotal for C2C12 myoblast differentiation. **Journal of cell science**, v. 125, n. 15, p. 3590-3600, 2012.

HAK, K. K. et al. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. **Journal of Cell Biology**, v. 174, n. 5, p. 677-687, 2006.

HAMRICK, M. W., MCPHERRON, A. C., LOVEJOY, C. O. Bone mineral content and density in the humerus of adult myostatin-deficient mice. **Calcified tissue international**, v. 71, n. 1, p. 63-68, 2002.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. 1998.

HOLTZER, H.; ABBOTT, J. Contraction of glycerinated embryonic myoblasts. **The Anatomical Record**, v. 131, n. 3, p. 417-428, 1958.

HUANG, M. et al. Insulin-like growth factor-1 receptor is regulated by microRNA-133 during skeletal myogenesis. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e29173, 2011.

HUANG, Q. K., QIAO, H. Y., FU, M. H., LI, G., LI, W. B., CHEN, Z., LIANG, B. S. MiR-206 attenuates denervation-induced skeletal muscle atrophy in rats through regulation of satellite cell differentiation via TGF- β 1, Smad3, and HDAC4 signaling. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 22, p. 1161, 2016.

HUANG, N., KNY, M., RIEDIGER, F., BUSCH, K., SCHMIDT, S., LUFT, F. C., FIELITZ, J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy. **Intensive care medicine experimental**, v. 5, n. 1, p. 3, 2017.

JAKOBSEN, J.; RESKE-NIELSEN, E. Diffuse muscle fiber atrophy in newly diagnosed diabetes. **Clinical neuropathology**, v. 5, n. 2, p. 73-7, 1986.

JANSSON, P. et al. Lactate release from the subcutaneous tissue in lean and obese men. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 1, p. 240, 1994.

JONES, S. W., HILL, R. J., KRASNEY, P. A., O'CONNER, B. A. R. B. A. R. A., PEIRCE, N., & GREENHAFF, P. L. Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. **The FASEB journal**, v. 18, n. 9, p. 1025-1027, 2004.

JONKMAN, J. E., CATHCART, J. A., XU, F., BARTOLINI, M. E., AMON, J. E., STEVENS, K. M., COLARUSSO, P. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. **Cell adhesion & migration**, v. 8, n. 5, p. 440-451, 2014.

JUNG, C. H., JUN, C. B., RO, S. H., KIM, Y. M., OTTO, N. M., CAO, J., KIM, D. H. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. **Molecular biology of the cell**, v. 20, n. 7, p. 1992-2003, 2009.

JUNG, C. H., RO, S. H., CAO, J., OTTO, N. M., KIM, D. H. mTOR regulation of autophagy. **FEBS letters**, v. 584, n. 7, p. 1287-1295, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica: Texto e Atlas. 12ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2013.

KALDERON, N.; GILULA, N. B. Membrane events involved in myoblast fusion. **The Journal of cell biology**, v. 81, n. 2, p. 411-425, 1979.

KIM, C.; NEWTON, K. M.; KNOPP, R. H. Gestational Diabetes and the Incidence of Type 2 Diabetes A systematic review. **Diabetes care**, v. 25, n. 10, p. 1862-1868, 2002.

KIM, V. N; NAM, J-W. Genomics of microRNA. **TRENDS in Genetics**, v. 22, n. 3, p. 165-173, 2006.

KIM, T. N. et al. Prevalence and Determinant Factors of Sarcopenia in Patients With Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 33, n. 7, p. 1497–1499, 2010.

KUKRETI, H., AMUTHAVALLI, K., HARIKUMAR, A., SATHIYAMOORTHY, S., FENG, P. Z., ANANTHARAJ, R., TAN, S. L. K., LOKIREDDY, S., BONALA, S., SRIRAM, S., MCFARLANE, C., KAMBADUR, R., SHARMA, M. Muscle-specific microRNA1 (miR1) targets heat shock protein 70 (HSP70) during dexamethasone-mediated atrophy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 9, p. 6663-6678, 2013.

LAGIRAND-CANTALOUBE et al. The initiation factor eIF3-f is a major target for Atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. **The EMBO journal**, v. 27, n. 8, p. 1266-1276, 2008.

LAI, K. et al. Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 21, p. 9295-9304, 2004.

LATRES, E., AMINI, A. R., AMINI, A. A., GRIFFITHS, J., MARTIN, F. J., WEI, Y., LIN, H. C., YANCOPOULOS, G. D., GLASS, D. J. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 4, p. 2737-2744, 2005.

LAU, N. C., LIM, L. P., WEINSTEIN, E. G., BARTEL, D. P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 858-862, 2001.

LECKER, S. H., SOLOMON, V., MITCH, W. E., GOLDBERG, A. L. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 1, p. 227S-237S, 1999.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.

LEE, S. et al. Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 6, p. 1537-1545, 2004.

LEE, H., LIM, J. Y., CHOI, S. J. Oleate Prevents Palmitate-Induced Atrophy via Modulation of Mitochondrial ROS Production in Skeletal Myotubes. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

LI, Zhen-Ya et al. Alteration of microRNA expression correlates to fatty acid-mediated insulin resistance in mouse myoblasts. **Molecular BioSystems**, v. 7, n. 3, p. 871-877, 2011.

LIEBER, R. L. Skeletal muscle structure, function, and plasticity. Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

MALLEY, C. O., PIDGEON, G. P. The mTOR pathway in obesity driven gastrointestinal cancers: Potential targets and clinical trials. **BBA clinical**, v. 5, p. 29-40, 2016.

MAMMUCARI, C., SCHIAFFINO, S., SANDRI, M. Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. **Autophagy**, v. 4, n. 4, p. 524-526, 2008.

MASI, L.N. Sensibilidade periférica à insulina e resposta inflamatória na vigência de dietas obesogênicas, suplementação com óleo de peixe e ausência de TLR-4. 2014. 170 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.

MCPHERRON, A. C., LEE, S. J. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 109, n. 5, p. 595-601, 2002.

OLEFSKY, J. M.; NOLAN, J. J. Insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus: cellular and molecular mechanisms. **The American journal of clinical nutrition**, v. 61, n. 4, p. 980S-986S, 1995.

OLENA, A. F.; PATTON, J. G. Genomic organization of microRNAs. **Journal of cellular physiology**, v. 222, n. 3, p. 540-545, 2010.

PANDA, A. C. et al. Novel RNA-binding activity of MYF5 enhances Ccnd1/Cyclin D1 mRNA translation during myogenesis. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 5, p. 2393-2408, 2016.

PARK, S. et al. Excessive loss of skeletal muscle mass in older adults with type 2 diabetes. **Diabetes care**, v. 32, n. 11, p. 1993-1997, 2009.

REZNICK, R. et al. Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis. **Cell metabolism**, v. 5, n. 2, p. 151-156, 2007.

ROMMEL, C. et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI (3) K/Akt/mTOR and PI (3) K/Akt/GSK3 pathways. **Nature cell biology**, v. 3, n. 11, p. 1009-1013, 2001.

ROSENBERG, Miriam I. et al. MyoD inhibits Fstl1 and Utrn expression by inducing transcription of miR-206. **The Journal of cell biology**, v. 175, n. 1, p. 77-85, 2006.

SABOURIN, Luc A. et al. Reduced differentiation potential of primary MyoD^{-/-} myogenic cells derived from adult skeletal muscle. **The Journal of cell biology**, v. 144, n. 4, p. 631-643, 1999.

SACHECK, J. et al. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 287, n. 4, p. E591-E601, 2004.

SALA, D.; ZORZANO, A. Differential control of muscle mass in type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 20, p. 3803-3817, 2015.

SANDRI, M. et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 399-412, 2004.

SCHAPPACHER-TILP, G., LEONARD, T., DESCH, G., HERZOG, W. A novel three-filament model of force generation in eccentric contraction of skeletal muscles. **PLoS one**, v. 10, n. 3, p. e0117634, 2015.

SCHMITZ-PEIFFER, C.; CRAIG, D. L.; BIDEN, T. J. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 34, p. 24202-24210, 1999.

SIEIRO-MOSTI, D., DE LA CELLE, M., PELÉ, M., MARCELLE, C. A dynamic analysis of muscle fusion in the chick embryo. **Development**, v. 141, n. 18, p. 3605-3611, 2014.

SILVA, M. D. P., CARVALHO, R. F. Cellular and molecular mechanisms that control muscular development and growth. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 21-31, 2007.

SILVA, M. T. Papel do adrenoceptor beta 2 na regeneração muscular esquelética. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.

SOKOL, N. S., AMBROS, V. Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. **Genes & development**, v. 19, n. 19, p. 2343-2354, 2005.

SU, Z. et al. Acupuncture plus Low-Frequency Electrical Stimulation (Acu-LFES) Attenuates Diabetic Myopathy by Enhancing Muscle Regeneration. **PLoS one**, v. 10, n. 7, p. e0134511, 2015.

TONDER, A. V., JOUBERT, A. M., CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC research notes**, v. 8, n. 1, p. 47, 2015

TOWNLEY-TILSON, WH Davin; CALLIS, Thomas E.; WANG, DaZhi. MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 42, n. 8, p. 1252-1255, 2010.

UMEGAKI, H. Sarcopenia and diabetes: Hyperglycemia is a risk factor for age-associated muscle mass and functional reduction. **Journal of diabetes investigation**, v. 6, n. 6, p. 623-624, 2015.

WANG, X. et al. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. **Endocrinology**, v. 147, n. 9, p. 4160-4168, 2006.

WEST, D. B.; YORK, B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. **American journal of clinical nutrition**, v. 67, n. 3, p. 505S-512S, 1998.

WINBANKS, C. E., BEYER, C., HAGG, A., QIAN, H., SEPULVEDA, P. V., & GREGOREVIC, P. miR-206 represses hypertrophy of myogenic cells but not muscle fibers via inhibition of HDAC4. **PLoS one**, v. 8, n. 9, p. e73589, 2013.

YANG, M. et al. Saturated fatty acid palmitate-induced insulin resistance is accompanied with myotube loss and the impaired expression of health benefit myokine genes in C2C12 myotubes. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, p. 104, 2013.

ZHANG, L. et al. Role of fatty acid uptake and fatty acid β -oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 1, p. 1-22, 2010.

WADA, S., KATO, Y., OKUTSU, M., MIYAKI, S., SUZUKI, K., YAN, Z., AKIMOTO, T. Translational suppression of atrophic regulators by microRNA-23a integrates resistance to skeletal muscle atrophy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 44, p. 38456-38465, 2011.

WANG, F., WANG, J., HE, J., LI, W., LI, J., CHEN, S., ZHANG, P., LIU, H., CHEN, X. Serum miRNAs miR-23a, 206, and 499 as Potential Biomarkers for Skeletal Muscle Atrophy. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.