FLÁVIA DE TOLEDO FRIAS

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.

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.

São Paulo
2016

FLÁVIA DE TOLEDO FRIAS

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.

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: Profa. Dra. Alice Cristina Rodrigues

Versão Original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Frias, Flávia de Toledo.

Papel dos microRNAs role (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 / Flávia de Toledo Frias. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dr. Alice Cristina Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Biomarcadores moleculares no desenvolvimento de doenças metabólicas.

Versão do título para o inglês: MicroRNAs role (miR-1, miR-133, miR-206, miR-208b, miR-499, and miR-223) in skeletal muscle of C57BL/6 mice during insulin resistance state.

1. MicroRNAs 2. Resistência à insulina 3. Metabolismo muscular 4. Capacidade oxidativa mitocondrial I. Rodrigues, Profa. Dra. Alice Cristina II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB034/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Flávia de Toledo Frias.

Título da Dissertação: 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.

Orientador(a): Profa. Dra. Alice Cristina Rodrigues.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA.071/2013.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 165/11/CEUA, datado de 29.11.2011 e por solicitação da Profa. Dra. **Alice Cristina Rodrigues**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Flávia de Toledo Frias** ao Projeto de Pesquisa "Avaliação de micrnas no desenvolvimento da resistência à insulina", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 05 de agosto de 2013.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da CEUA

ICB/USP

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz e Eliane, à minha irmã Fernanda e ao Vitor, meu companheiro de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a todos que colaboraram para que este trabalho fosse realizado e especialmente:

À minha orientadora, profa. Alice Cristina Rodrigues, pela energia, amizade e generosidade em compartilhar seus conhecimentos. Foi uma honra ser sua primeira aluna de mestrado. Seu bom-humor e dedicação foram essenciais no meu desenvolvimento.

Ao prof. Rui Curi, por me receber sempre tão bem e carinhosamente, por confiar no meu trabalho e me permitir utilizar seu laboratório que foi a minha segunda casa no ICB.

Aos profs. Andréa Torrão, Luiz Roberto Britto e William Festuccia, por disponibilizarem seus laboratórios e os equipamentos necessários para realização de alguns experimentos.

As colegas de bancada, companheiras de almoço e amigas com quem compartilhei maior parte desse período:

Amanda, pessoa com um coração enorme, sempre disposta a ajudar. Obrigada pelos muitos conselhos, apoio e alegria compartilhada.

Maysa, sinceridade e simplicidade em pessoa, sempre pronta a me ouvir e a compartilhar de suas experiências. Obrigada pela generosidade, confiança e amizade sempre disponível.

Karina, amiga sensual e maravilhosa, sua chegada trouxe muito mais alegria aos meus dias, sejam estes aqui ou quando estava fora. Seu apoio e amizade foram essenciais nessa caminhada.

Maricota, obrigada pelo seu companheirismo, fico feliz em ver seu sucesso e seu crescimento constante, você merece muito.

Aos demais colegas/amigos que já passaram e aos que continuam pelo laboratório: Pati, Guga, Érica, Ailma, Alexandre, Lucas e a Catarina, especialmente, por desenvolver a figura explicativa final da discussão.

Aos colegas/amigos de outros laboratórios que já passaram e que continuam tornando o trabalho e os almoços na copinha divertidos: Diogo, Laure, Mari, Gabriel, Roberta, Renata, Kaio, Takeo, Mit, Thiago, Alex.

Em especial, a colega Amanda Martins, sua ajuda foi essencial desde o início para que o sonho de realizar o estágio no exterior fosse concretizado. Obrigada pela bondade e preocupação.

Ao prof. Sandro Hirabara e ao técnico Gilson Murata pelo auxílio nos experimentos de metabolismo em músculo sóleo isolado e ensaio enzimático, respectivamente.

Aos técnicos e especialistas dos laboratórios, Tatiana, Gil, Patrícia, Adilson e Sidney, por toda paciência, atenção e apoio durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos bioteristas, Bob e Sandra pela ajuda no trabalho com os animais.

Aos professores e funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas.

Aos professores Joris Hoeks e Patrick Schrauwen (Maastricht University - Holanda) e a todo seu grupo de trabalho, em especial, os colegas Denis e Alexandre que me receberam tão bem e tanto me ensinaram durante seis meses de estágio em seu laboratório.

Aos meus amados pais e irmã, que sempre me deram todo suporte que precisei para buscar meus sonhos. Eu só tenho a agradecer por tanto amor e compreensão.

Ao meu amor Vitor Madella, pelas longas conversas, paciência, apoio incondicional, carinho e companheirismo. Sua presença alegra meus dias e me torna alguém melhor.

À minha segunda família, Dona Tânia, Vicente, Zé e Tati que sempre apoiaram meus sonhos mesmo sabendo que isso me deixaria distante. Obrigada por me receberem de braços abertos em sua família.

À FAPESP (processos 2013/19787-0 e 2014/25992-9), CAPES e CNPQ, pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento da pesquisa.

“Só os tolos sabem de tudo. O sábio aprende algo novo todo dia.”
(Autor Desconhecido)

RESUMO

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.

A resistência à insulina (RI) ocasionada pela obesidade é uma condição presente na maioria dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). No músculo esquelético, especificamente, evidências sugerem que a concentração elevada de ácidos graxos (AGs) livres observada na obesidade desempenha papel central no desenvolvimento da RI por causarem alterações na oxidação de AGs, na biogênese e função mitocondrial. Sendo os microRNAs (miR ou miRNA) moléculas recentemente apontadas na regulação gênica de vias metabólicas, temos como objetivo investigar em músculo esquelético de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, se os miRs-1a, 133a/b, 206, 208b e 499 (específicos para músculo) e miR-223 (não-específico) participam da patogênese da RI, regulando genes envolvidos com a oxidação de AGs. Para indução da RI, camundongos machos da linhagem C57BL/6 foram alimentados com dieta balanceada (C) ou hiperlipídica (H) durante 8 semanas. O tratamento com fenofibrato (F) se iniciou duas semanas antes do sacrifício, quando aos animais foram administrados por gavagem 50 mg/kg/dia de fenofibrato (CF e HF) ou metilcelulose 0,5% (veículo; grupos C e H). Após 8 semanas de dieta hiperlipídica, o grupo H apresentou RI sistêmica e no músculo sóleo isolado com expressão diminuída dos miRs-1a, -133a e -206. A dieta hiperlipídica provocou um aumento da β -oxidação mitocondrial de AGs no músculo esquelético oxidativo frente à alta disponibilidade de AGs provenientes da dieta com consequente diminuição do metabolismo da glicose observados através da maior transcrição dos genes *Pgc1 α* , *Cpt1b*, *Esrry*, *Pdk4*, *Fabp3* e *Acot2*, maior atividade das enzimas citrato sintase (CS) e β -HAD e também o aumento da fosforilação da proteína quinase AMPK α 2 em sua porção Thr172, quando comparados ao grupo C, corroborando com a teoria de competição entre substratos. O tratamento dos camundongos obesos com fenofibrato (HF) melhorou a sensibilidade à insulina no músculo sóleo e foi capaz de reverter a diminuição da expressão do miR-1a e o aumento da expressão de *Pgc1 α* , *Cpt1b*, *Esrry*, *Pdk4*, *Fabp3* e *Acot2* e fosforilação da AMPK α 2 ao exercer sua ação como agonista dos receptores nucleares PPAR α aumentando a oxidação de AGs no fígado com consequente diminuição dos triglicerídeos plasmáticos no organismo combatendo a sobrecarga lipídica para o músculo. O efeito do fenofibrato parece ser mediado pelo miR-1a e possivelmente sua ação regulando seu alvo predito, o gene *Prkaa2*, que transcreve a proteína AMPK α 2 como demonstrado no ensaio funcional de ganho e perda de função. Dessa forma, nossos resultados nos levam a um intenso interesse em desvendar se no futuro, o miR-1a serviria como um potencial alvo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento do DM2 e alterações metabólicas associadas.

Palavras-chave: MicroRNAs. Resistência à insulina. Metabolismo muscular. Mitocôndria.

ABSTRACT

FRIAS, F. T. **MicroRNAs role (miR-1, miR-133, miR-206, miR-208b, miR-499 e miR-223) in skeletal muscle of C57BL/6 mice during insulin resistance state.** 2016. 80 p. Master thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Insulin resistance induced by obesity is a condition present in most subjects with type 2 diabetes mellitus (T2DM). In skeletal muscle tissue, specifically, evidences suggest that the high concentration of free fatty acids (FFAs) observed in obesity plays a central role in the development of IR causing changes in FFAs oxidation, mitochondrial biogenesis and function. Since microRNAs (miR or miRNA) are recently identified molecules acting as gene regulators of metabolic pathways, we aim to investigate in skeletal muscle of high-fat diet induced obese mice, if miRs-1a, 133a / b, 206, 208b and 499 (muscle-specific) and miR-223 (non-specific) are involved in IR pathogenesis by regulating genes involved in FFAs oxidation. For induction of IR, C57BL/6 male mice were fed a balanced (C) or hyperlipidemic (H) diet for 8 weeks. Fenofibrate treatment (F) began two weeks before euthanasia, administered by gavage in 50 mg / kg / day of fenofibrate (CF and HF) or 0.5% methylcellulose (vehicle; groups C and H). After 8 weeks of high fat diet, the H group showed both systemic and in isolated soleus muscle IR with decreased expression of miRs-1a-133a and -206. The high fat diet caused an increase in skeletal muscle mitochondrial FFAs β -oxidation due to the high FFAs availability from the diet with consequent reduction in glucose metabolism observed through the increased transcription of *Pgc1 α* , *Cpt1b*, *Esrry*, *Pdk4*, *Fabp3* and *Acot2* genes, increased citrate synthase (CS) and β -HAD enzymes activity and also increased phosphorylation of protein kinase, AMPK α 2 in Thr172 portion, when compared to the C group, corroborating to the substrates competition theory. The treatment of obese rats with fenofibrate (HF) improved insulin sensitivity in soleus muscle and was able to reverse the reduction in miR-1a expression and increased *Pgc1 α* , *Cpt1b*, *Esrry*, *Pdk4*, *Fabp3* and *Acot2* RNAm expression and AMPK α 2 phosphorylation by action as an agonist of PPAR α nuclear receptors, augmenting FFAs oxidation in the liver with consequent decrease in plasma triglycerides in hole body fighting the fat overload in the muscle. In conclusion, fenofibrate positive effect appears to be mediated by miR-1a and possibly their action regulating its predicted target, the *Prkaa2* gene that transcribes the AMPK α 2 protein as shown in the functional assay of gain and loss of function in C2C12 cells. Thus, our results lead us to an intense interest in unraveling if miR-1a would serve as a potential target for the development of new therapeutic strategies to treat T2DM and related metabolic disorders.

Key-words: MicroRNAs. Insulin resistance. Skeletal muscle metabolism. Mitochondria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cascata de regulação via PGC1 α	18
Figura 2 - Metabolismo de ácidos graxos e o Ciclo de Randle.....	20
Figura 3 - Biogênese dos miRNAs	24
Figura 4 - Fluxograma dos meios e métodos utilizados no trabalho.....	29
Figura 5 - Testes de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT).....	44
Figura 6 - Metabolismo da glicose em resposta à insulina no músculo sóleo isolado.	46
Figura 7 - Expressão dos miRNAs em músculo sóleo de camundongos alimentados com dieta balanceada (C) ou hiperlipídica (H) e tratados ou não com fenofibrato....	48
Figura 8 - Expressão dos miRNAs em músculo gastrocnêmio de camundongos alimentados com dieta balanceada (C) ou hiperlipídica (H) e tratados ou não com fenofibrato.	49
Figura 9 - Expressão de RNAm de possíveis alvos dos miRNAs relacionados com a biogênese e função mitocondrial no músculo sóleo de camundongos.....	51
Figura 10 - Expressão de RNAm de possíveis alvos dos miRNAs relacionados com a biogênese e função mitocondrial no músculo gastrocnêmio de camundongos.....	53
Figura 11 - Predição de alvos do miR-1a	55
Figura 12 - Expressão proteica dos possíveis alvos do miR-1a relacionados com a biogênese e função mitocondrial no músculo sóleo de camundongos.....	56
Figura 13 - Correlações significativas entre o miR-1a e a expressão de RNAm dos genes da via de biogênese mitocondrial e metabolismo de AGs e glicose	58
Figura 14 - Padronização da indução de resistência à insulina na linhagem celular C2C12 avaliada através da fosforilação de Akt em serina 473..	59

Figura 15 - Expressão do miR-1a em células C2C12 transfetadas com controle “scramble” (C) e padronização da transfecção com agente mimético (ganho de função; mimic miR-1a) ou inibidores do miR-1a (perda de função).....	60
Figura 16 - Expressão da proteína AMPK α em células C2C12 transfetadas com controle “scramble” (C), com agente mimético (mimic miR-1a) ou inibidor do miR-1a	61
Figura 17 - Expressão de genes relacionados à biogênese mitocondrial (<i>Pgc1α</i> , <i>Esrry</i>), metabolismo de AGs (<i>Cpt1b</i>) e glicose (<i>Pdk4</i>) ativados via AMPK, em células C2C12	62
Figura 18 - Expressão de genes relacionados à biogênese mitocondrial (<i>Pgc1α</i> , <i>Esrry</i>), metabolismo de AGs (<i>Cpt1b</i>) e glicose (<i>Pdk4</i>) ativados via AMPK, em células C2C12 com resistência à insulina.	63
Figura 19 - Expressão de p-AKT em células C2C12 transfetadas com controle “scramble” sem ácido palmítico (C) e com (P) e com mimic miR-1a tratadas com ácido palmítico (mimic P)	65
Figura 20 - Esquema representativo do desenvolvimento da resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica em músculo sóleo de camundongos C57BL/6 e a ação regulatório dos miRNAs.....	66
Figura 21 - Esquema representativo do efeito do tratamento com fenofibrato no desenvolvimento da resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica em músculo sóleo de camundongos C57BL/6 e a ação regulatório do miR-1a nesta via.	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados para quantificação da expressão de RNAm dos genes de interesse.....	36
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais	30
Tabela 2 - Características gerais dos camundongos alimentados com dieta balanceada (C) ou hiperlipídica (H) e tratados ou não com fenofibrato por duas semanas.....	41
Tabela 3 - Perfil bioquímico dos camundongos alimentados com dieta balanceada (C) ou hiperlipídica (H) e tratados ou não com fenofibrato.....	43
Tabela 4 - Parâmetros metabólicos avaliados em camundongos alimentados com dieta balanceada (C) ou hiperlipídica (H) e tratados ou não com fenofibrato.....	43
Tabela 5 - Atividade enzimática avaliada em camundongos alimentados com dieta balanceada (C) ou hiperlipídica (H) e tratados ou não com fenofibrato	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Músculo esquelético e a β -oxidação mitocondrial	17
1.2 Dieta hiperlipídica e mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência à insulina no músculo	19
1.3 PPARs, metabolismo da glicose e de ácidos graxos	22
1.4 MicroRNAs e regulação de genes alvos envolvidos com a obesidade e a resistência à insulina	23
2 OBJETIVOS	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Animais	30
3.2 Dietas	30
3.3 Protocolo experimental e terapêutico	31
3.4 Ingestão alimentar, ganho de peso e massa de gordura	31
3.5 Parâmetros plasmáticos	31
3.6 Avaliação da responsividade à insulina	32
3.6.1. Teste de tolerância à glicose (TTG)	32
3.6.2. Teste de tolerância à insulina (ITT)	32
3.6.3. Responsividade à insulina em músculo sóleo isolado	33
3.7 Cultura de células musculares esqueléticas	33
3.7.1. Protocolo experimental "in vitro"	34
3.8 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCR)	35
3.8.1. Extração de RNA	35
3.8.2. Quantificação de miRNA	35
3.8.3. Quantificação de RNAm	36
3.9 Quantificação da expressão proteica por Western Blotting	37
3.10 Atividade Enzimática	38
3.11 Análise por bioinformática para predição de RNAm alvos	38
3.12 Análise Estatística	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Peso corpóreo e das gorduras viscerais	40

4.2 Perfil bioquímico dos animais.....	42
4.3 Avaliação da responsividade à insulina sistêmica	43
4.4 Responsividade à insulina em músculo sóleo isolado	45
4.5 Expressão de miRNAs em músculo esquelético de camundongos	46
4.6 Expressão de RNAm dos possíveis alvos dos miRNAs em músculo esquelético de camundongos	50
4.7 Análise preditiva de possíveis alvos da ação do miR-1a.....	54
4.8 Expressão proteica dos alvos diretos e indiretos do miR-1a relacionados com a β-oxidação mitocondrial.....	55
4.9 Atividades de enzimas chaves do metabolismo energético	57
4.10 Análises de correlação	58
4.11 Análise funcional do miR-1a	59
5 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de lipídeos no tecido adiposo e está associada a um grande número de disfunções metabólicas como a resistência à insulina, que pode levar ao diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). Segundo a OMS, 44% dos casos de diabetes são atribuíveis ao sobrepeso (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

A resistência à insulina (RI) é definida como uma menor resposta à ação da insulina nos tecidos-alvos para esse hormônio (músculo esquelético, fígado e adipócitos), caracterizada por hiperinsulinemia com normo ou hiperglicemia (BRUCE; HANSON, 2010). No estado de RI, os AGs são os principais combustíveis no músculo, uma vez que a oxidação de glicose está prejudicada. Uma vez que a glicose não está sendo incorporada e que a concentração plasmática de AG livres está elevada, o envolvimento desses metabólitos na redução das ações da insulina tem sido proposto (BODEN, 2003; KRAEGEN; COONEY, 2008; OAKES et al., 1997; RANDLE et al., 1963).

Vários mecanismos vêm sendo apontados na tentativa de explicar como os níveis elevados de AGs podem contribuir para o desenvolvimento da RI no músculo esquelético, dentre eles estão o ciclo de Randle, o acúmulo de derivados lipídicos intracelulares (diacilglicerol e ceramida), o estresse oxidativo, a inflamação e a modulação da transcrição de genes relacionados à biogênese e função mitocondrial provocando modificações na β -oxidação mitocondrial de AGs (MARTINS et al., 2012; RUSSEL et al., 2014; ZHANG et al., 2010).

1.1 Músculo esquelético e a β -oxidação mitocondrial

O músculo esquelético representa aproximadamente 40% do peso total do corpo possuindo grande demanda energética para que possa cumprir com seu papel fisiológico no movimento do organismo (HITACHI; TSUCHIDA, 2013).

Os AGs são importantes combustíveis energéticos para os músculos cardíaco e esquelético oxidativo, sendo metabolizado principalmente nas mitocôndrias, maior sítio celular de formação de energia. A principal fonte de AG para o músculo são os triglicerídeos (TG) liberados através da lipólise do tecido adiposo e de depósitos

intracelulares do tecido muscular. Os AGs entram no citoplasma das células musculares por difusão ou via proteínas de membrana transportadoras de AGs como a translocase de ácidos graxos (CD36/FAT), as proteínas ligadoras aos ácidos graxos (FABPs) e a proteína transportadora de ácidos graxos de cadeia longa (FATP) e sofrem uma reação de esterificação resultando em moléculas de acil-CoA de cadeia longa. Esse acil-CoA de cadeia longa será captado para o interior da mitocôndria pelas enzimas carnitina palmitoiltransferases 1 e 2 (CPT1 e CPT2), que estão localizadas na membrana mitocondrial, ou também poderá ser catalisado pela enzima acil-CoA tioesterase (ACOT2) em AGs livres e CoASH afim de que os níveis de Acil-CoAs disponíveis para a β -oxidação sejam regulados (FUJITA et al., 2011). Através do ciclo da β -oxidação esses acil-CoAs de cadeia longa serão então transformados em moléculas de acetil-CoA, que por sua vez entram no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) na matriz mitocondrial, o que resulta na produção das coenzimas reduzidas nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH₂). A re-oxidação dessas coenzimas na cadeia respiratória mitocondrial gera um gradiente de prótons, que é então convertido em energia química pela ATP-sintetase (na fosforilação de adenosina difosfato-ADP), que é alimentado pelo fluxo de retorno dos prótons à matriz mitocondrial, formando ATP (ZHANG et al., 2010); ou através da ligação de proteínas desacopladoras (UCPs) que transformam essa energia em calor para o controle da termogênese do organismo.

Figura 1. Cascata de regulação via PGC1 α . TH: Hormônio da tireoide; NOS/cGMP: óxido nítrico sintase; p38MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; SIRT6: sirtuínas, CaN: calcineurina; CaMKs: proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina; AMPK: proteína quinase ativada por AMP; CDKs: quinases dependentes de ciclina e β /cAMP: estimulação β -adrenérgica tem sido demonstrada na regulação da expressão e/ou atividade de PGC-1 α . PGC-1 α coativa fatores de transcrição como os fatores de respiração nuclear (NRFs), receptores relacionados ao estrogênio (ERRs), e PPARs, conhecidos por regularem diferentes aspectos do metabolismo energético como a biogênese mitocondrial, oxidação de ácidos graxos e antioxidantes (VENTURA-CLAPIER; GARNIER; VEKSLER, 2008).

Sendo assim para que a mitocôndria possa exercer suas funções fisiológicas na oxidação de AGs de forma orquestrada, existem cascatas de sinalização moleculares finamente reguladas para garantir a biogênese, a função e dinâmica enzimática mitocondrial (CHENG; RISTOW, 2013; RASMUSSEN; WOLFE, 1999; VENTURA-CLAPIER; GARNIER; VEKSLER, 2008). Como apresentado na **figura 1**, o co-ativador 1 α do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC1 α) é considerado o maior regulador da biogênese mitocondrial por sua ação via receptores de estrogênio (ERRs) α e γ , receptores nucleares ativados pelo proliferador de peroxissoma (PPARs) α e β e no fator de respiração nuclear-1 (NRF1), levando a transcrição de genes que integram sinais fisiológicos e elevam a biogênese e função mitocondriais (LIN; HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2005; PUIGSERVER et al., 1998; WU, Z. et al., 1999).

Dessa forma, diversas hipóteses que envolvem alterações na regulação enzimática e na função e biogênese mitocondrial têm sido estudadas para o melhor entendimento de como o aumento da disponibilidade de AGs na obesidade, influencia o desenvolvimento da resistência à insulina e desenvolvimento do DM2. (CHENG; ALMEIDA, 2014; MUOIO; NEUFER, 2012; TURNER et al., 2007).

1.2 Dieta hiperlipídica e mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência à insulina no músculo

De um modo geral parece que nos estágios iniciais de resistência à insulina o músculo esquelético responde a intervenções com dieta hiperlipídica com uma resposta adaptativa positiva devido aos altos níveis de AGs disponíveis. Em estudos com ratos Wistar e Zucker obesos (fa/fa), camundongos C57BL/6J e db/db alimentados com dietas com alto teor de gordura foi observado no músculo esquelético um aumento na expressão de vários marcadores da capacidade

oxidativa e função mitocondrial, como: o transportador CPT1, a enzima citrato sintase, a proteína desacopladora 3 (UCP3) e PGC1 α (HANCOCK et al., 2008; SHORTREED et al., 2009; TURNER et al., 2007).

Randle et al. (1963) foram os primeiros a propor a relação entre o aumento da β -oxidação de AGs com a diminuição do metabolismo da glicose no músculo. Como apresentado na **figura 2**, esta ideia foi explicada pela competição entre substratos. O aumento da formação de acetil-CoA, NADH e FADH₂ derivados da β -oxidação de AGs, ativa a enzima piruvato desidrogenase quinase 4 (PDK4), a qual impede a ação do complexo piruvato desidrogenase (PDH), responsável pela descarboxilação oxidativa de piruvato a acetil-CoA. A menor oxidação de glicose resulta em acúmulo de glicose-6-fosfato (G6P) no citoplasma, inibindo a enzima hexoquinase II. Além disso, o aumento de acetil-CoA originado da β -oxidação de AGs e que é encaminhado para o ciclo TCA, permite maior formação de citrato, o qual inibe a enzima fosfofrutoquinase-1 (PFK), com consequente diminuição da glicólise. Ao mesmo tempo, a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), subunidade catalítica α -2 (AMPK α 2), isoforma predominante no músculo esquelético, sofre fosforilação em sua porção Thr172, se tornando ativa e dessa forma provocando o aumento da β -oxidação de AGs através da inibição de outra enzima, a acetil-CoA carboxila (ACC) impedindo a formação de malonil-CoA, e por sua vez, impedindo sua ação de inibição da proteína transportadora de AGs para mitocôndria, CPT1 (ZHANG; ZHOU; LI, 2009; ZHANG et al., 2010)

Figura 2. Metabolismo de ácidos graxos e o Ciclo de Randle. FAT/CD36, FABPpm, FATP: proteínas de membrana transportadoras de AGs; TG: triglicerídeos; CPT-1 e -2: carnitina palmitoiltransferases 1 e 2; ATP: adenosina trifosfato; ACC: acetil-CoA carboxilase; MCD: malonil-CoA descarboxilase; AMPK: proteína quinase ativada por AMP; GLUT 4 e 1: transportadores de glicose tipo 4 e 1; PFK: fosfofrutoquinase; PDH: piruvato desidrogenase (ZHANG et al., 2010).

Em contrapartida, estudos em camundongos, no qual o tempo de dieta hiperlipídica é estendido, demonstram diminuição da biogênese e função mitocondrial ao apresentarem menor atividade do transportador CPT1, das enzimas citrato sintase e β -hidroxiacil-CoA desidrogenase, analisadas no músculo esquelético (HULVER et al., 2003; SIMONEAU; KELLEY, 1997), como também menor expressão de *Pgc1 α* e de outros genes que codificam proteínas dos complexos I, II, III e IV da cadeia transportadora de elétrons (SPARKS et al., 2005).

A principal hipótese apontada para a diminuição da capacidade oxidativa mitocondrial é a de que o acúmulo de intermediários lipídicos de reações incompletas de β -oxidação contribuem para o stress oxidativo (MUOIO; KOVES, 2007). O descasamento entre a entrega de equivalentes redutores, tais como NADH e FADH₂ derivados do ciclo do TCA para a cadeia de transporte de elétrons pode levar a um aumento na razão ATP/ADP, o que aumenta a gradiente de prótons e facilita a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (ANDREYEV; KUSHNAREVA; STARKOV, 2005). A mitocôndria é o principal local de produção de EROs no músculo esquelético, sendo que estes podem reagir com AGs formando peróxidos lipídicos o que leva a danos e modificações estruturais nas enzimas e DNA mitocondriais que, em longo prazo, podem resultar em prejuízos na função da organela (BLOCH-DAMTI; BASHAN, 2005; INDO et al., 2007; SCHRAUWEN; HESSELINK, 2004). EROs também tem sido apontados na ativação de proteínas inflamatórias, tais como JNK, PKC e IKK β , cuja ativação pode contribuir para a resistência à insulina (ZHANDE et al., 2002).

Tomados em conjunto, pode-se especular que a diminuição da β -oxidação dos AGs baseadas nas características acima não poderia ser uma causa direta da resistência à insulina na obesidade, mas sim uma consequência secundária de resistência à insulina/obesidade. Uma possível prova que sustenta esta noção é um estudo em ratos onde a resistência à insulina desenvolve-se durante o curso da alimentação com dieta hiperlipídica e de elevado teor de sacarose sem disfunção mitocondrial. No entanto, diminuição da biogênese, da estrutura e função

mitocondrial foi observada quando a dieta é estendida e ocorre o desenvolvimento do diabetes (BONNARD et al., 2008).

Dessa forma, intervenções farmacológicas direcionadas ao metabolismo de AGs se tornam potenciais no tratamento da resistência à insulina e doenças metabólicas restabelecendo o equilíbrio entre a disponibilidade de ácidos graxos e glicose como fonte de energia para o organismo. Como mostrado na **figura 1**, PPAR α e PPAR β/δ estão envolvidos na transcrição de genes relacionados com o metabolismo de lipídeos e, por conseguinte, a modulação da atividade de PPAR tornou-se um alvo atraente para o tratamento da obesidade e doenças metabólicas. O fenofibrato, fármaco pertencente à classe dos fibratos, são agonistas dos receptores PPAR α , são hipolipemiantes utilizados no tratamento da hipertrigliceridemia. Sua eficácia em baixar os níveis plasmáticos de TG e AGs livres está associada ao aumento da oxidação de ácidos graxos (MARTIN et al., 1997; SCHOONJANS et al., 1995; STAELS et al., 1998). Um efeito secundário dos fibratos é a melhora da resistência à insulina (GUERRE-MILLO et al., 2000), possivelmente devido à redução de lipídeos plasmáticos permitindo menor oferta de AGs para as células musculares, aliviando a "sobrecarga de lipídeos" nestes tecidos (ZHANG et al., 2010).

1.3 PPARs, metabolismo da glicose e de ácidos graxos

Os receptores ativados pelo proliferador de peroxissoma (PPAR) são fatores de transcrição que pertencem à superfamília de receptores nucleares. PPAR α é expresso principalmente no fígado, músculo e coração, PPAR γ no tecido adiposo, enquanto o PPAR β/δ é expresso de maneira ubíqua (DESVERGNE et al., 1998).

O PPAR β/δ compartilha muitos genes alvos com o PPAR α , incluindo genes envolvidos com a utilização de AGs na célula (HUSS; KELLY, 2004; MONTAGNER et al., 2011). Surpreendentemente, no entanto, camundongos transgênicos com expressão forçada tanto para PPAR α como para PPAR β/δ especificamente no músculo esquelético exibem diferenças fenotípicas marcantes. Camundongos transgênicos para PPAR α no músculo exibem acúmulo de TG no miócito, altas taxas de oxidação de AGs, intolerância à glicose e resistência à insulina leve. Em contraste, camundongos transgênicos para PPAR β/δ no músculo desenvolvem

fenótipo característico de camundongos exercitados (“camundongos de maratona”) que incluem melhora da resistência ao exercício, capacidade mitocondrial aumentada, aumento da proporção de fibras oxidativas tipo I e maior sensibilidade à insulina (FINCK et al., 2005; LUQUET et al., 2003; WANG et al., 2004). Os mecanismos envolvidos no controle energético do metabolismo entre essas duas linhagens de camundongos transgênicos para PPAR envolvem uma complexa rede de regulação gênica. Gan et al. (2011) mostraram que o receptor nuclear PPAR β/δ , mas não o PPAR α , é capaz de aumentar a capacidade de oxidação de glicose pelo músculo esquelético, pela ativação da transcrição gênica da lactato desidrogenase b (LDHB). Já um estudo mais recente do mesmo grupo, mostra que as ações opostas desses receptores nucleares sobre as fibras musculares tipo I no músculo esquelético envolve a regulação da expressão de microRNAs músculo-específicos como o miR-499 e miR-208b (GAN et al., 2013).

1.4 MicroRNAs e regulação de genes alvos envolvidos com a obesidade e a resistência à insulina

Hoje em dia milhares de miRNAs já foram identificados em mais de 50 organismos. Os miRNAs podem ser produzidos em qualquer tecido do organismo ou até mesmo ser secretados por vesículas extracelulares (VEs) como exossomas e microvesículas e dessa forma serem distribuídos através dos fluídos corporais e serem captados por células vizinhas ou até mesmo tecidos distantes onde efetuarão sua atividade biológica (SUN et al., 2015).

Estima-se que eles controlem milhares de genes que codificam proteínas envolvidas em diferentes processos biológicos. Em seres humanos, cerca de um terço destes pequenos RNAs são organizados em *clusters* no genoma humano, sendo que um dado *cluster* é susceptível de ser uma única unidade de transcrição, sugerindo uma regulação coordenada de miRNAs possivelmente levando a diversidade combinatória e sinergia nos efeitos biológicos. No entanto, é interessante notar que os miRNAs de um cluster não são expressos em níveis iguais, o que sugere que os miRNAs também são regulados pós-transcricionalmente (LEE; DUTTA, 2009; YU et al., 2006).

Como representado na **figura 3**, à biogênese dos miRNAs pela via canônica se inicia no núcleo da célula a partir de genes de miRNA, que estão localizados

principalmente nas regiões intergênicas, intrônicas e policistônicas, com a formação de um miRNA primário (pri-miRNA) através da ação da enzima RNA polimerase II. Ainda no núcleo este pri-miRNA é processado para um precursor em miRNA (pré-miRNA) por um complexo composto por uma enzima RNase III (Drosha) e uma proteína ligadora de RNA dupla fita, DGCR8 (complexo Drosha/DGCR8), e então é exportado para o citoplasma pela exportina-5, onde será clivado por outro complexo composto pela endoribonuclease *Dicer* e uma proteína ligadora de RNA-tar (TRBP) – complexo Dicer/TRBP, produzindo um *duplex* de ~22 nucleotídeos. Uma das fitas do *duplex* é carregada no complexo de silenciamento de RNA induzido (RISC) contendo a proteína Argonauta (Ago) e GW182. Este é o passo final da biogênese do miRNA; o miRNA maduro, fita simples ligado ao complexo RISC está pronto para se ligar ao RNAm e levar à repressão translacional ou desestabilização do RNAm. A outra via menos comum de biogênese dos miRNAs é denominada via não canônica que corresponde ao processamento do miRNA independente do complexo Drosha. (ROTLLAN; FERNANDEZ-HERNANDO, 2012; ROTTIERS; NÄÄR, 2012).

Figura 3. Biogênese dos miRNAs. miRNA: MicroRNA; pri-miRNA: miRNA primário; pré-miRNA: miRNA precursor; DGCR8: proteína ligadora de RNA dupla fita; TRBP: proteína

ligadora de RNA-tar; RISC: complexo de silenciamento de miRNA (retirado de: ROTTIERS; NÄÄR, 2012).

O miRNA maduro age no RNAm através do pareamento de bases Watson-Crick por complementariedade. O elemento de reconhecimento do miRNA (MRE) normalmente se encontra na 3'UTR do RNAm, embora possam estar presentes na região 5'UTR do RNAm ou até mesmo em regiões codificadoras de genes em humanos ou outros mamíferos (DUURSMA et al., 2008; TAY et al., 2008). A especificidade da interação do miRNA-RNAm é conferida principalmente pelos primeiros 7-8 nucleotídeos de um miRNA (região *seed* 5'proximal), que é suficiente para regulação do gene alvo *in vivo* (BRENNECKE et al., 2005). O mecanismo preciso pelo qual o miRNA pode causar repressão da tradução ainda não está completamente elucidado. No entanto, estudos crescentes vêm demonstrando que os miRNAs e suas micro-ribonucleoproteínas (microRNPs) podem desencadear funções alternativas que permitam a estimulação da expressão gênica, além das suas funções repressivas, e que estas seriam dependentes da sequência de RNA, do microRNP associado e das condições celulares (LEE; VASUDEVAN, 2013).

Como apresentado anteriormente, o estado de resistência à insulina apresenta alterações importantes no RNAm e proteínas nos tecidos alvos. A descoberta da existência de miRNAs específicos para certos tecidos, especificamente músculo estriado, fígado e adiposo, levanta a questão sobre o envolvimento dos miRNAs no controle transcricional induzido pela insulina nesses tecidos (LIANG et al., 2007).

Os miRNAs músculo-específicos, miR-1a, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208a, miR-208b e miR-499, estão envolvidos em vários processos no músculo esquelético, incluindo no processo de proliferação e diferenciação muscular (LUO; NIE; ZHANG, 2013), especificação do tipo de fibra (GAN et al., 2013), regeneração e hipertrofia (HITACHI; TSUCHIDA, 2013) e alterações na expressão desses miRNAs estão associados a desordens do músculo esquelético (GEORGANTAS et al., 2014; MCCARTHY, 2014).

Em especial os miRNAs, miR-1a, miR-133a/b 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). O miR-208b é codificado no íntron 31 do gene β -MHC (*Myh7*) do cromossomo 14 e o miR-499 no íntron 19 do *Myh7b* no cromossomo 2 (McGUIGAN; PHILLIPS; POSTLETHWAIT, 2004; VAN ROOJI et al., 2009).

O miR-206, miR-208b e miR-499 foram detectados com maior expressão em fibras de contração lenta do tipo 1, enquanto o miR-1a, miR-133a e -133b são altamente expressos em músculo esquelético e cardiomiócitos (ENDO et al., 2013).

Até o momento alguns trabalhos constataram redução da expressão dos miR-1a, miR-133a, miR-133b e miR-206 em modelos *in vitro* e *in vivo* de resistência à insulina e DM2 (CHEN et al., 2012; GALLAGHER et al., 2010; NIELSEN et al., 2010), demonstrando uma possível participação desses miRNAs na fisiopatologia dessas doenças.

Em relação ao miR-208b e miR-499, como apontado anteriormente, eles participam das ações opostas dos receptores nucleares PPAR β/δ e PPAR α sobre as fibras musculares tipo I.

A sensibilidade à insulina do organismo e o transporte de glicose mediado pela insulina são positivamente correlacionados com a proporção de fibras musculares tipo I (DAUGAARD et al., 2000), onde a redução da atividade física, como ocorre em estados de obesidade e de doenças crônicas, resulta em uma redução da proporção de fibras tipo I e IIa, juntamente com uma reduzida disponibilidade de glicose muscular e sensibilidade à insulina (ZIERATH; HAWLEY, 2004). Gan et al. (2013), mostraram que o PPAR β/δ conjuntamente com ERR γ ativam a transcrição dos genes *Myh7* e *Myh7b* no músculo esquelético, aumentando os níveis de miR-208b e miR-499, e assim desencadeando a cascata de expressão gênica de proteínas musculares de contração lenta. Já o receptor PPAR α suprime a expressão desses miRNAs.

O miR-223, músculo não específico foi apontado como regulador do transportador de glicose, GLUT4, que medeia a captação de glicose estimulada pela insulina no músculo e no tecido adiposo. Defeitos funcionais no tráfego intracelular e translocação na membrana plasmática do GLUT4 resultam em alterações na captação de glicose estimulada por insulina no músculo (SHEPHERD; KAHN, 1999).

Utilizando biópsias de músculo ventricular infectados com vetores adenovírus de miR-223 (Ad-miR-223), Lu et al. (2010), demonstraram um aumento significativo na captação de glicose sem estimulação com insulina e que esse aumento foi inibido usando siRNA contra GLUT4.

Como mostrado acima, apesar de evidências que apontam esses miRNAs no desenvolvimento da resistência à insulina, ainda não se sabe como eles agem e se estratégias farmacológicas que tenham eles como alvos podem restaurar a sensibilidade à insulina. Desse modo, buscamos verificar se os miRNAs selecionados, os miR-1a, miR-133a/b, miR-206, miR-208b, miR-499 e miR-223 apresentam expressão alterada no músculo esquelético resistente à insulina, suas possíveis vias de regulação gênica e ainda se a manipulação da expressão desses miRNAs trariam efeitos benéficos na sensibilidade à insulina no músculo.

2 OBJETIVOS

O principal objetivo desse estudo foi investigar a participação dos miRNAs específicos para músculo (miR-1a; miR-206; miR-133a/b; miR-208b e miR499) e do músculo não específico (miR-223) no desenvolvimento da resistência à insulina do músculo esquelético de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica tratados ou não com o agonista dos receptores PPAR α , fenofibrato. Além disso, investigar os possíveis genes alvos de ação desses miRNAs.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Na **figura 4** está apresentado um fluxograma em que sintetizamos os meios e métodos utilizados no trabalho.

Figura 4. Fluxograma dos meios e métodos utilizados no trabalho. CT: colesterol total; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; TG: triglicérides; ALT: alanina transaminase; TOTG: teste de tolerância oral à glicose; TTI: teste de tolerância à insulina.

3.1 Animais

Camundongos machos (n=60) da linhagem C57BL/6 com 4 semanas de idade foram adquiridos do biotério de camundongos do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) e mantidos em sala com ciclo claro-escuro de 12-12 h e temperatura de 23 ± 2 °C, com dieta normal, ração Nuvital (Nuvilab., Colombo, PR., Brasil) e água *ad libitum* até o início dos tratamentos (8 semanas de idade). Todos os procedimentos desse estudo seguiram os princípios éticos de experimentação animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do ICB-USP (protocolo nº 165/11).

3.2 Dietas

Tabela 1. Composição das dietas experimentais

COMPOSIÇÃO	DB	DHL
	g/Kg	
Amido	465,7	115,5
Caseína	140	200
Amido dextrinizado	155	132
Sacarose	100	100
Óleo de soja	4	35
Banha suína	36	315
Fibra	50	50
Mix mineral	35	35
Mix vitamínico	10	10
L-cistina	1,8	3
Bitartarato de colina	2,5	2,5

O protocolo experimental foi conduzido utilizando uma dieta balanceada (DB) com 76kcal% de carboidratos, 9kcal% de lipídeos e 15kcal% de proteínas ou uma dieta hiperlipídica (DHL) com 26kcal% de carboidratos, 59kcal% de lipídeos e 15kcal% proteínas (ROPELLE et al., 2006). Ambas foram preparadas de acordo com

as recomendações do Instituto Americano de Nutrição para camundongos adultos (REEVES, 1997), diferindo somente na densidade energética (DB = 3803 Kcal/Kg dieta, DHL = 5340 Kcal/Kg dieta) e no conteúdo de proteína (**Tabela 1**). A quantidade de proteína foi modificada na DHL a fim de corrigir a redução da ingestão desse nutriente pelos animais submetidos à dieta obesogênica. As fontes de proteínas e lipídeos na dieta foram caseína, óleo de soja e banha suína, respectivamente.

3.3 Protocolo experimental e terapêutico

Os animais com 8 semanas de idade (n=60) foram divididos em dois grandes grupos: alimentados com dieta balanceada (**C**) e alimentados com dieta hiperlipídica (**H**). Após 6 semanas de dieta, os animais do grupo C ou H foram divididos em dois novos grupos e a eles foi administrado por gavagem oral metilcelulose 0,5% (C e H) ou fenofibrato 50 mg/kg/dia (**CF e HF**) por 2 semanas. Ao final de 8 semanas, esses animais foram eutanasiados e então coletamos amostras de sangue, tecido adiposo branco (epididimal, mesentérico, retroperitoneal), fígado, músculos sóleo e gastrocnêmio e tíbia. No sangue coletado realizamos as análises bioquímicas; todos os tecidos coletados foram pesados e normalizados pelo comprimento da tíbia. Através do peso dos depósitos de tecido adiposo branco verificamos a adiposidade dos animais. Nos músculos sóleo e gastrocnêmio quantificamos a expressão dos miRNAs, RNAm e proteínas.

3.4 Ingestão alimentar, ganho de peso e massa de gordura

O peso e a ingestão alimentar foram acompanhados ao longo dos tratamentos. Ao final mensuramos o peso dos depósitos da gordura epididimal, retroperitoneal e mesentérica.

3.5 Parâmetros plasmáticos

Das amostras de sangue coletadas foi obtido o soro através de dupla centrifugação. A primeira com baixa rotação de 3000 rpm por 10 minutos a 4 °C

onde aspiramos o sobrenadante e transferimos para um novo tubo do qual realizamos nova centrifugação a 13.500 rpm por 10 minutos a 4 °C, da onde coletamos o sobrenadante novamente e transferimos para um novo tubo. A partir deste realizamos a concentração sérica de glicose, colesterol total, colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), colesterol da lipoproteína de alta densidade, triglicerídeos (TG) e alanina aminotransferase (ALT) que foram avaliados por ensaios enzimáticos, através de kits específicos (Bioclin., Belo Horizonte, BH., Brasil). A concentração de insulina sérica foi determinada por *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) através do kit específico Rat/Mouse Insulin ELISA kit, (EMD Millipore., Billerica, MA., USA).

3.6 Avaliação da responsividade à insulina

3.6.1. Teste de tolerância à glicose (TTG)

Para a construção da curva glicêmica após sobrecarga de glicose, os animais em restrição alimentar por 6 horas receberam uma dose de glicose (2 g/100 g p.c.) por injeção intraperitoneal e suas glicemias foram monitoradas nos tempos 0 (pré-injeção), 30, 60 e 90 minutos. A concentração de insulina plasmática também foi monitorada durante o TTG e para tal, foram coletados amostras de sangue nos tempo 0, 15, 30, 60 e 90 min. Para determinação da glicemia e da insulina plasmática, foram coletados 5 µL e 20 µL de sangue capilar caudal, respectivamente.

3.6.2. Teste de tolerância à insulina (ITT)

Para a construção da curva glicêmica após sobrecarga de insulina, os animais em restrição alimentar por 6 horas receberam uma dose de insulina (2 UI/kg de peso corpóreo) por injeção intraperitoneal e suas glicemias foram monitoradas a cada 10 min. A glicemia foi mensurada por tiras de glicemia, através do glicosímetro por coleta de sangue capilar caudal, nos seguintes tempos: 0 (pré-injeção) e 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos após a administração de insulina. Em caso de choque hipoglicêmico, administramos doses mínimas de glicose via intraperitoneal e os dados posteriores à injeção de glicose foram descartados da análise.

3.6.3. Responsividade à insulina em músculo sóleo isolado

Os músculos sóleos foram isolados e incubados como previamente descrito (CRETIAZ et al., 1980; CHALLISS et al., 1986). Os camundongos foram sacrificados em câmara de CO₂, seus músculos sóleos cuidadosa e rapidamente isolados, mantidos com tensão de repouso com *clips* de inox, pesados (7-10 mg) e pré-incubados em tampão bicarbonato de Krebs-Ringer contendo 5,6 mM de glicose, pH 7,4, por 30 min em banho aquecido a 37 °C, 95% O₂ e 5% CO₂, com agitação contínua (100 oscilações/min). Após este período, os músculos foram transferidos para outros frascos contendo o mesmo tampão, porém acrescido de 0,3 µCi/mL de [U-¹⁴C]-D-glicose e 0,2 µCi/mL de 2-deoxi-[2,6-³H]-D-glicose. Feniletilamina (0,4 mL), diluída em metanol (1:1, v/v), foi adicionada em compartimento separado para adsorção do ¹⁴CO₂. Os músculos foram incubados na ausência ou presença de 7 nM de insulina, por 1 hora, nas mesmas condições. A gaseificação foi mantida por mais 15 min e então interrompida. Ao final da incubação, os músculos foram brevemente lavados em salina (0,9% de NaCl) a 4 °C e congelados em nitrogênio líquido. Em seguida, foram realizadas as mensurações da captação de 2-deoxi-[2,6-³H]-Dglicose, incorporação de [U-¹⁴C]-D-glicose, síntese de [¹⁴C]-glicogênio e descarboxilação de [U-¹⁴C]-D-glicose, segundo métodos descritos por (CHALLISS et al., 1986; ESPINAL et al., 1983; ENGLE; JONES, 1978; LEIGHTON et al., 1985), respectivamente.

3.7 Cultura de células musculares esqueléticas

A cultura de células C2C12 de camundongo foi realizada segundo o método descrito por Schmitz-Peiffer et al. (1999).

Os mioblastos de C2C12 foram cultivados em frascos contendo o meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) com baixa concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Invitrogen., Barcelona., Spain) e 1% de antibiótico (50 UI/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina), sendo assim denominado de meio de proliferação, a 37 °C com 5% de CO₂, e então foram plaqueados em placas de 6 poços (50.000 células/poço).

Para diferenciação das células C2C12 em miotubos, as placas foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂, com DMEM de baixa concentração de glicose, suplementado com 2% de soro de cavalo (Gibco-Invitrogen) e 1% de penicilina-estreptomicina, denominado de meio de diferenciação.

Cada experimento foi realizado em triplicata em um único dia, sendo assim um número de dois experimentos consiste de 6 replicatas realizadas em dois dias diferentes.

3.7.1. Protocolo experimental “*in vitro*”

Após plaqueadas, as células C2C12 foram incubadas em meio de proliferação até que atingissem a confluência de 50-70%, confluência sugerida no protocolo do reagente de transfecção utilizado. O mimetizador do miR-1a (472818-004) ou seu controle “scramble” (479902-004) a 1 nM, ou o inibidor do miR-1a (4102482-002) ou seu controle “scramble” (199006-002), a 10 nM, todos adquiridos através da Exiqon (Exiqon., Woburn, MA., USA), foram transfectados nas células C2C12 com o uso do reagente de transfecção, Interferim (Polyplus., New York, NY., USA) por 18 horas. As células foram então incubadas com meio de diferenciação para que os mioblastos se diferenciasssem em miotubos por 48 horas, sendo que nas últimas 16 horas induzimos a resistência à insulina através da adição do ácido palmítico como descrito por Chavez et al. 2005. Para isso, 75 mM de ácido palmítico foi solubilizado em etanol absoluto, e estes foram novamente diluídos a proporção de 1:25 em solução contendo meio de diferenciação com 2% de BSA, para que o ácido palmítico pré-conjugasse ao BSA. Finalmente, outra diluição foi feita na proporção de 1:4 em meio de diferenciação para que a concentração final de ácido palmítico adicionada nas células fosse de 0,75 mM. Ao controle adicionamos etanol 99%. Nos 15 minutos que antecederam a coleta das células, foram adicionados ou não para cada grupo, 7 nM de insulina. Em resumo, no final obtivemos quatro grupos (controle+insulina; palmítico+insulina, controle-insulina e palmítico-insulina). A fosforilação de Akt em serina 473 foi avaliada pela técnica de Western blotting (descrita no item 3.9) para verificação da resistência à insulina.

3.8 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCR)

A expressão dos miRNAs e de genes envolvidos no metabolismo (glicose e ácidos graxos) e função mitocondrial foram avaliados em músculo sóleo, gastrocnêmio e na linhagem de células musculares C2C12.

3.8.1. Extração de RNA

O RNA total dos músculos sóleo foi extraído através do kit mirVana PARIS_Protein e RNA Isolation kit (Cat.: 1556, Ambion) e gastrocnêmio através do kit mirVana_ miRNA Isolation Kit (Cat.: 1561, Ambion) de acordo com o protocolo do fabricante (Thermo Fisher Scientific., USA). As células C2C12 foram homogeneizadas em reagente TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) para extração do RNA total (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987). O RNA total extraído foi quantificado por leitura no aparelho Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific) e o grau de pureza determinado pela razão 260/280 nm (razão igual a 2 indicando alto grau de pureza).

3.8.2. Quantificação de miRNA

Conforme descrito por Chen et al. (2005), a quantificação relativa dos miRNAs foi feita pela técnica Stem Loop RT-qPCR. O cDNA foi sintetizado a partir de 10 ng (músculos sóleo e gastrocnêmio) e 50 ng (células C2C12) do RNA total extraído de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando o kit Taqman microRNA Reverse Transcription (P/N: 4366597, Thermo Fisher Scientific) contendo 10 X RT buffer, 25 X mix de dNTPs (100 mM total), RNase inhibitor (20 U/μL) e enzima MultiScribe reverse transcriptase (50 U/μL) juntamente com 50 nM de TaqMan® MicroRNA Assays (Thermo Fisher Scientific). A expressão dos miRNAs foi realizada pelo método TaqMan de qPCR, utilizando o cDNA diluído 15 vezes. Os iniciadores e sondas necessários para cada miRNA foram adquiridos da Thermo Fisher através dos seguintes Assays: snoRNA-202 (001232), hsa-miR-1a (002222), hsa-miR-133a (002246), hsa-miR-133b (002247), hsa-miR-206 (000510), hsa-miR-208b (002290), hsa-miR-223 (002295) e hsa-miR-499 (001352). A quantificação relativa dos

miRNAs foi feita em termociclador ABI Prism 7500 (Thermo Fisher Scientific), seguindo o protocolo universal de amplificação; 95 °C 10 min seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C 1min. Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando o sno-202 como gene de referência.

3.8.3. Quantificação de RNAm

A expressão de RNAm dos genes preditos por bioinformática e selecionados para verificação foi realizada por reação de transcrição reversa através do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (P/N: 4374967, Thermo Fisher Scientific) a partir de 500 ng (músculos sóleo e gastrocnêmio) e 2000 ng (células C2C12) de RNA total extraído, seguida de amplificação por PCR em tempo real utilizando o SYBR Green como marcador fluorescente juntamente com os primers de interesse. A quantificação da expressão gênica também foi feita pelo método de comparação relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando-se o gene *36b4* como referência.

Quadro 1. Sequências dos *primers* utilizados para quantificação da expressão de RNAm dos genes de interesse

Gene	Sequência Oligonucleotídeo Senso (5'→ 3')	Sequência Oligonucleotídeo Antisenso (3'→ 5')
<i>Fabp3</i>	ATGACCGGAAGGTCAAGTCAC	CCCGTTCCACTTCTGCACAT
<i>Acot2</i>	TTGGTGGTAATGCATTCGTC	TTTGTCGTCTTACGGCACTG
<i>Irs1</i>	CTCAGTCCCAACCATAACCAG	GAGTGTTTCATAGGCGAGATGG
<i>Glut4</i>	CATTCCCTGGTTCATTGTGG	GAAGACGTAAGGACCCATAGC
<i>Ppara</i>	GCACTGGAAGTGGATGACAG	TTTAGAAGGCCAGGACGATCT
<i>Pparβ</i>	TCCATCGTCAACAAAGACGGG	ACTTGGGCTCAATGATGTAC
<i>Cpt1b</i>	CCTCCGAAAAGCACCAAAC	GCTCCAGGGTTCAGAAAGTAC
<i>Pgc1α</i>	CACCAAACCCACAGAAACAG	GGGTCAGAGGAAGAGATAAAGTTG
<i>Esrry</i>	TGACTTGGCTGACCGAG	CCGAGGATCAGAATCTCC
<i>Ucp3</i>	GACTATGGATGCCTACAGAACC	ACTCCAGCAACTTCTCCTTG
<i>Pdk4</i>	GTTCTTCACACCTTCACCAC	CCTCCTCGGTCAGAAATCTTG
<i>Sod2</i>	CAGACCTGCCTTACGACTATGG	CTCGGTGGCGTTGAGATTGTT

Fabp3: Fatty acid binding protein 3; *Acot2*: Acyl-CoA thioesterase 2; *Irs1*: Insulin receptor substrate 1; *Glut4*: Glucose transporter 4; *Ppara*: Peroxisome proliferator activated receptor alpha; *Pparβ*: Peroxisome proliferator activated receptor beta; *Cpt1*: carnitine

palmitoyltransferase I; *Pgc1α*: peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha; *Esrrγ*: estrogen-related receptor gamma; *Ucp3*: uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier); pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4; *Sod2*: superoxide dismutase-2.

3.9 Quantificação da expressão proteica por Western Blotting

Para extração utilizamos o kit miRvana PARIS, onde 1 músculo sóleo foi homogeneizado em tampão Cell Disruption com coquetel de inibidor de proteases (Sigma Aldrich., St. Louis, MO., USA). Para extração proteica das células C2C12, os poços foram raspados em tampão RIPA [50 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4), 1% Triton X-100, 1% deoxicolato de sódio, 150 mmol/l NaCl, 0,1% SDS, 1 mmol/l EDTA e 1% de coquetel de inibidor de protease. Os lisados foram incubados a 4 °C por 30 min, seguidos de centrifugação a 10,000 x g, 4 °C por 15 min. O conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Uma alíquota com 30 µg de proteínas em tampão de amostra (Tris-HCl 100mM pH 6.8; mercaptoetanol 5%; SDS 2%; glicerol 20% e azul de bromofenol 0,01%) foi submetida à eletroforese SDS-PAGE (10% poliácridamida) e então transferido para uma membrana de nitrocelulose. A eficiência da transferência foi avaliada pela coloração da membrana com Ponceau S 0,2%, e então as membranas foram bloqueadas por 1 h e 30 min a temperatura ambiente, com leite desnatado a 5% em TBS [Tris-HCl 20 mM, (pH 7,5), NaCl 0,9%] para minimizar as ligações inespecíficas. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas 3 x 10' com TBS-Tween e incubadas a 4 °C, overnight com os anticorpos primários de interesse. Após serem lavadas novamente 3 x 10' com TBS-Tween, foram incubadas com o anticorpo secundário específico conjugado com peroxidase (diluído 1:10000 em TBS-Tween) por 2 h a temperatura ambiente, sob agitação. A seguir, a membrana foi lavada 3 x 10' com TBS-Tween e as bandas marcadas com anticorpo foram visualizadas utilizando "Clarity™ Western ECL Substrate" (BIO-RAD., California, CA., USA).

Os anticorpos utilizados até o momento foram: Anti-PGC1alpha (ab54481 – Abcam), Anti-AMPKα (#2532 - Cell signalling Technology., Boston, MA., USA), Anti-phospho AMPKα (Thr172) (#2535, Cell signalling Technology), Anti-CPT1b (NBP1-59576, Novus Biologicals., Littleton, CO., USA), Anti-AKT (#9272, Cell signalling Technology), Anti-phospho AKT (Ser473) (#4051S- Cell signalling Technology), Anti-

GADPH (sc32233, Santa Cruz., Dallas, TX., USA) nas diluições de 1:1000. Anticorpos secundários Anti-camundongo (A9044) e Anti-coelho (A0545) da Sigma-Aldrich nas diluições de 1:10000 e 1:15000, respectivamente. Como normalizador da expressão proteica utilizamos a proteína GAPDH e em alguns casos, o padrão de expressão do Ponceau respectivo de cada gel. O sinal foi quantificado através do software NIH ImageJ 1.63.

3.10 Atividade Enzimática

Para avaliação da atividade enzimática de algumas enzimas chaves do ciclo de Krebs (citrato sintase (CS)), do processo de oxidação de ácidos graxos (AGs) (beta-hidroxilacil-CoA desidrogenase (β -HAD)), da via glicolítica (hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK)) e, utilizou-se músculo sóleo, o qual foi homogeneizado na proporção 1:100 em tampão de extração, constituído de 50 mM Tris Base e 1 mM de EDTA, pH 7,4. Posteriormente, esse homogenato foi centrifugado a 1.300 g, por 15 min a 4 °C. As alíquotas do sobrenadante foram separadas para dosagem em espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices., CA, USA) e normalizados pela expressão proteica analisada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A atividade das enzimas foi analisada segundo os protocolos descritos previamente de Alp et al. (1976), Crabtree et al. (1972), Hengartner et al. (1975) e Lynen. (1955). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em nmol/min x mg de proteína⁻¹.

3.11 Análise por bioinformática para predição de RNAm alvos

Os possíveis RNAm alvos dos miRNAs escolhidos foram investigados por análise *in silico*, utilizando-se os algoritmos de predição: microRNA.org (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) e TargetScan (<http://www.targetscan.org>). Ambos os algoritmos predizeram os sítios de ligação dos miRNAs na 3'-UTR do RNAm alvo baseado na sequência *seed* de 7-8 bases de tamanho presente na terminação 5'do miRNA.

3.12 Análise Estatística

Os dados foram apresentados com média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e analisados por análise multivariada como One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls, Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni e Student *t-test* conforme o caso. O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Peso corpóreo e das gorduras viscerais

Com a finalidade de induzir obesidade e resistência à insulina, alimentamos os camundongos C57BL/6 com dieta rica em lipídeos, obtendo um modelo experimental que representa quadros comumente vistos em clínica. Tanto a escolha pelos camundongos da linhagem C57BL/6, estes que possuem propensão à obesidade e resistência à insulina, como a escolha das dietas utilizadas se basearam em estudos já realizados em nosso grupo e também outros para caracterização deste modelo (BUETTNER; SCHÖLMERICH; BOLLHEIMER, 2007; ROPELLE et al., 2006).

Durante as 8 semanas de protocolo experimental, foram monitoradas o peso corporal dos animais uma vez por semana e o consumo de ração duas vezes por semana.

Na **tabela 2** pode-se observar que o peso no início do protocolo (peso inicial) não foi diferente entre os grupos, mas que após as oito semanas de dieta, os camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (H) tiveram seu peso aumentado significativamente quando comparados aos camundongos alimentados com dieta balanceada (C). O tratamento com fenofibrato reduziu o ganho de peso dos camundongos em ambos os grupos (CF e HF), o que não foi atribuído a um consumo alimentar diminuído nesses animais.

O consumo alimentar foi diferente somente nos grupos que receberam dieta hiperlipídica em relação aos seus respectivos controles, dessa forma pode-se observar que apesar da menor ingestão alimentar pelos animais dos grupos que receberam dieta hiperlipídica, essa dieta apresentou maior eficiência energética em relação à dieta balanceada.

Em relação à composição da gordura visceral, sendo este um parâmetro conclusivo que caracteriza a obesidade (CAREY et al., 1997), observamos um maior depósito de gordura retroperitoneal, mesentérica e epididimal no grupo H quando comparados ao grupo C. O tratamento com fenofibrato preveniu o acúmulo de gordura quando comparado ao grupo que recebeu só dieta hiperlipídica.

Tanto o peso final reduzido, como a diminuição da adiposidade observada nos grupos tratados com fenofibrato (CF e HF) não é surpreendente, uma vez que camundongos deficientes em PPAR α são obesos (CHAPUT et al., 2000; LIU et al., 2014). Esses efeitos podem ser atribuídos principalmente ao aumento do metabolismo de AGs pelo fígado (MANCINI et al., 2001) ou também à redução do consumo alimentar, hipótese da qual não foi sustentada no nosso modelo (dados não mostrados), e/ou aumento do gasto energético.

Tabela 2. Características gerais dos camundongos alimentados com dieta balanceada (C) ou hiperlipídica (H) e tratados ou não com fenofibrato por duas semanas

	C	H	CF	HF
Peso Inicial (g)	23,53 $\pm$ 0,52	23,61 $\pm$ 0,47	22,79 $\pm$ 0,50	23,71 $\pm$ 0,41
Peso final (g)	26,84 $\pm$ 0,48	33,38 $\pm$ 0,79*	24,33 $\pm$ 0,63*	30,52 $\pm$ 0,62#
Ganho de peso (g)	3,31 $\pm$ 0,53	9,77 $\pm$ 0,86*	1,54 $\pm$ 0,46*	6,81 $\pm$ 0,46#
Consumo alimentar (g/dia/animal)	4,28 $\pm$ 0,06	2,36 $\pm$ 0,05	4,34 $\pm$ 0,05	2,37 $\pm$ 0,05
Tecido adiposo retroperitoneal (g)	0,149 $\pm$ 0,009	0,49 $\pm$ 0,04*	0,114 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,03#
Tecido adiposo epididimal (g)	0,53 $\pm$ 0,03	1,49 $\pm$ 0,13*	0,38 $\pm$ 0,02	0,99 $\pm$ 0,07#
Tecido adiposo mesentérico (g)	0,29 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,04*	0,23 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,02#
Fígado (g)	1,01 $\pm$ 0,03	1,03 $\pm$ 0,03	1,49 $\pm$ 0,05*	1,74 $\pm$ 0,04#
Músculo sóleo (g)	0,42 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,04*	0,44 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,04
Músculo gastrocnêmio (g)	6,93 $\pm$ 0,22	7,56 $\pm$ 0,15	6,74 $\pm$ 0,13	6,94 $\pm$ 0,22

Tratamento com fenofibrato (50 mg/Kg/dia) (CF e HF) ou com metilcelulose 0,5% (C e H) nas duas últimas semanas do protocolo experimental de 8 semanas de dieta. *# p<0,05: (*) vs C; (#) vs H, por análise multivariada *Two-Way ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni*. Valores representam média $\pm$ EPM com n $\pm$ 15 animais.

Já ao analisarmos o peso do fígado, observamos um aumento do peso úmido do fígado tanto no grupo CF como também no HF quando comparados ao controle. Este aumento também foi encontrado por Mancini et al, (2001), sendo que os hepatócitos após tratamento com fenofibrato não continham gotas lipídicas em contraste aos hepatócitos dos animais alimentados com dieta hiperlipídica. Uma causa possível para o aumento do peso do fígado seria pela ação do fenofibrato nos

receptores PPAR α , promovendo a proliferação de peroxissomos nesse tecido, uma vez que estas organelas estão relacionadas com o metabolismo energético em roedores (EVANS; BARISH; WANG, 2004). No entanto, pela quantificação sérica da alanina aminotransferase (ALT), um marcador específico de lesão hepática (**Tabela 3**), pode-se inferir que o fármaco não está ocasionando danos à membrana dos hepatócitos.

Os músculos sóleo e gastrocnêmio também foram pesados e normalizados pelo tamanho da tíbia do animal. Os camundongos que foram alimentados com dieta hiperlipídica tiveram um aumento do peso do músculo sóleo, e o tratamento com fenofibrato não atenuou esse aumento (**Tabela 2**). Ainda não sabemos a causa desse aumento, mas podemos supor que esse aumento no peso pode ser em decorrência do acúmulo de gordura ectópica nesse tecido.

4.2 Perfil bioquímico dos animais

Os fibratos, agonistas dos receptores PPAR α , são hipolipemiantes utilizados no tratamento da hipertrigliceridemia. Sua eficácia em baixar os níveis plasmáticos de TG e AGs livres está associada ao aumento da absorção de AGs pela indução da expressão da proteína transportadora de AGs (FATP), através do aumento da atividade da acil-CoA sintase levando a diminuição da disponibilidade de AGs para a síntese de TG e também aumentando a expressão de genes mitocondriais relacionados à oxidação de AGs no fígado (MARTIN et al., 1997; SCHOONJANS et al., 1995; STAELS et al., 1998). A administração de fenofibrato também está relacionada com aumento dos níveis de HDL-C por estimulação da produção de ApoA I e II no fígado facilitando o transporte reverso de colesterol e consequentemente uma melhor depuração do colesterol (BERTHOU et al., 1996; VU-DAC et al., 1995).

De acordo com o esperado, o fenofibrato reduziu a concentração sérica de TG e aumentou o HDL-C apenas no grupo que recebeu dieta hiperlipídica (HF). Por outro lado, aumentou a concentração sérica de colesterol total nesse grupo (**Tabela 3**), possivelmente como reflexo das concentrações séricas aumentadas para HDL-C.

Tabela 3. Perfil bioquímico dos camundongos alimentados com dieta balanceada (C) ou hiperlipídica (H) e tratados ou não com fenofibrato

	C	H	CF	HF
Colesterol Total (mg/dL)	142,2 ± 6,86	146,5 ± 6,36	146,9 ± 6,17	196,7 ± 5,80#
Colesterol LDL (mg/dL)	82,4 ± 7,02	90,5 ± 5,87	94,4 ± 7,17	115,8 ± 10,43
Colesterol HDL (mg/dL)	63,3 ± 9,42	38,1 ± 6,29*	56,4 ± 4,38	77,5 ± 5,22#
Triglicérides (mg/dL)	75,4 ± 4,57	79,2 ± 4,30	54,6 ± 3,53*	48,5 ± 3,91#
ALT (U/min)	13,8 ± 2,24	22,3 ± 5,40	12,5 ± 2,91	10,6 ± 1,01#

Tratamento com fenofibrato (50 mg/Kg/dia) (CF e HF) ou com metilcelulose 0,5% (C e H) nas duas últimas semanas do protocolo experimental de 8 semanas de dieta. *# p<0,05: (*) vs C; (#) vs H, por análise multivariada *Two-Way ANOVA*. Valores representam média±EPM com n±10 animais.

4.3 Avaliação da responsividade à insulina sistêmica

Para verificar a sensibilidade à insulina, foram realizados testes de tolerância à glicose e à insulina após 6 horas de restrição alimentar, na última semana do protocolo experimental, com intervalo de 3 dias entre os testes.

Nos resultados obtidos com o GTT, verificamos que tanto a insulinemia, quanto a glicemia de jejum estavam aumentadas no grupo H, mas que os animais do grupo HF reverteram esta condição (**Tabela 4**).

Tabela 4. Parâmetros metabólicos avaliados em camundongos alimentados com dieta balanceada (C) ou hiperlipídica (H) e tratados ou não com fenofibrato

	C	H	CF	HF
Glicemia jejum (mg/dL)	166,2 ± 7,07	213,7 ± 8,71*	154,1 ± 5,04	184 ± 9,44#
Insulinemia jejum (ng/mL)	1,08 ± 0,18	1,77 ± 0,17*	0,51 ± 0,04*	0,76 ± 0,05#
AUC GTT	17338 ± 814,1	25114 ± 1458*	15661 ± 721,8	23053 ± 774,4
kITT (% glicose/min)	4,46 ± 0,48	2,80 ± 0,08*	3,01 ± 0,20	3,41 ± 0,10

Tratamento com fenofibrato (50 mg/Kg/dia) (CF e HF) ou com metilcelulose 0,5% (C e H) nas duas últimas semanas do protocolo experimental de 8 semanas de dieta. GTT: Curva glicêmica após sobrecarga de glicose; AUC: área incremental sob a curva da glicose sérica; kITT: taxa de desaparecimento da glicose sanguínea. *# p<0,05: (*) vs C; (#) vs H, por

análise multivariada *Two-Way* ANOVA. Valores representam média±EPM com $n\pm 10$ animais.

Nos resultados obtidos com o GTT, observamos que o pico glicêmico após injeção de glicose foi maior entre o grupo que recebeu dieta hiperlipídica, e estes não conseguiram retornar aos seus valores de glicemia basal quando comparados ao grupo C, representado pela maior área incremental sob a curva (AUC), caracterizando uma intolerância à glicose nesses animais. O fenofibrato, não melhorou a intolerância à glicose desenvolvida após oito semanas de dieta hiperlipídica (HF). Nos grupos que receberam dieta balanceada as curvas glicêmicas não foram diferentes. Apesar disto e embora sem diferença significativa, pode-se notar que após 90 min de sobrecarga de glicose, enquanto que no grupo H a glicemia não diminui, no grupo HF, ela começa a diminuir (**Tabela 4 e Figura 5**).

Figura 5. Testes de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT). Curva glicêmica após sobrecarga de glicose (GTT) nos tempos 0, 30, 60 e 90 min e área incremental sob a curva da glicose sérica. Curva glicêmica de decaimento da glicose no sangue após sobrecarga de insulina (ITT) e a taxa de desaparecimento da glicose sanguínea (KITT). Todos experimentos realizados em camundongos alimentados com dieta balanceada (C) ou hiperlipídica (H) e tratados ou não com fenofibrato. *# $p<0,05$: (*) vs C; (#) vs H, por análise multivariada *Two-Way* ANOVA. Valores representam média±EPM com $n\pm 10$ animais.

Os dados referentes ao ITT foram utilizados para montar a curva de decaimento da concentração plasmática de glicose após sobrecarga de insulina. Em

relação a este parâmetro, notamos que o grupo H parte de uma glicemia basal maior, e que mesmo após sobrecarga de insulina, a constante de desaparecimento da glicose sanguínea (kITT) é menor quando comparada ao decaimento encontrado no grupo C, sendo este outro indicativo de resistência à insulina nos animais alimentados com dieta hiperlipídica. O grupo HF parte com glicemia basal menor que o grupo H sendo que após 60 minutos atinge glicemia idêntica a dos grupos que receberam dieta balanceada com ou sem fenofibrato (C e CF), mesmo que de forma mais lenta como apresentado através da ausência de diferença significativa na kITT no grupo HF quando comparado ao grupo que recebeu somente dieta (**Tabela 4 e Figura 5**). Sendo o músculo esquelético o responsável pela captação de ~80% da glicose pós-prandial estimulada pela insulina, os resultados encontrados no ITT parecem reproduzir à melhora da sensibilidade à insulina periférica muscular encontrada nos resultados apresentados a seguir referentes à responsividade à insulina em músculo sóleo isolado.

Sendo assim, podemos concluir que a resistência à insulina induzida pela dieta hiperlipídica e consequentemente a obesidade está bem caracterizada no modelo utilizado e que o fenofibrato induz um efeito protetor de melhora na sensibilidade à insulina periférica, do qual já foi sugerido em outros trabalhos (GUERRE-MILLO et al., 2000), apesar de os mecanismos pelos quais esses medicamentos exercem seus efeitos ainda não estarem totalmente esclarecidos.

4.4 Responsividade à insulina em músculo sóleo isolado

Avaliamos no músculo sóleo, constituído por fibras do tipo I oxidativas, se a melhora da sensibilidade à insulina se traduziu em melhora da captação e utilização da glicose pelo músculo esquelético estimulado pela insulina. Vários grupos verificaram que o tratamento com AGs saturados em célula muscular esquelética afeta o metabolismo de glicose, na presença de insulina (HIRABARA; CURI; MAECHLER, 2010; LIPINA et al., 2013).

Na **figura 6** observa-se que o grupo que recebeu apenas dieta balanceada (C) a insulina estimulou a captação de glicose, a síntese de glicogênio, a oxidação da glicose e a incorporação da glicose. Já o grupo H, alimentado com DHL não foi responsivo à insulina indicando que o músculo desses camundongos está resistente

à insulina. O tratamento com fenofibrato de animais que receberam DHL (HF) induz a uma maior captação de glicose e síntese de glicogênio, no entanto não apresenta efeitos na oxidação e na incorporação da glicose. Ao avaliarmos o efeito do fenofibrato em animais alimentados com dieta balanceada (CF), nota-se uma diminuição da oxidação de glicose no músculo desses animais quando comparados ao grupo C. A partir desses dados, somado ao fato de o fenofibrato ser um agonista de PPAR α , conclui-se, portanto, que o fenofibrato deve estar aumentando a oxidação de AGs com concomitante diminuição da oxidação da glicose nesse tecido.

Figura 6. Metabolismo da glicose em resposta à insulina no músculo sóleo isolado. Camundongos alimentados com dieta balanceada (C) ou hiperlipídica (H) e tratados ou não com fenofibrato. (-) músculo não estimulado com insulina; (+) músculo estimulado com insulina; *# $p < 0,05$: (*) vs C; (#) vs H, por análise multivariada *Two-Way ANOVA*. Valores representam média $\pm$ EPM com $n \pm 10$ animais.

4.5 Expressão de miRNAs em músculo esquelético de camundongos

Após a caracterização do quadro de resistência à insulina em camundongos da linhagem C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica e da melhora da sensibilidade à insulina no músculo esquelético após administração de fenofibrato nesses animais, verificamos a expressão dos miRNAs músculo-específicos, miR-1a,

miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208b e miR-499 e do músculo não específico miR-223 nos músculos sóleo e gastrocnêmio por PCR em tempo real.

Existem dois tipos principais de fibras que constituem os músculos esqueléticos, as quais apresentam diferenças marcantes em relação à contração, metabolismo e suscetibilidade à fadiga. As fibras tipo I de contração lenta são ricas em mitocôndrias e tem elevada capacidade oxidativa para produção de energia, o que proporciona um fornecimento estável e de longa duração de ATP e, portanto, são resistentes à fadiga. As fibras tipo II compreendem três subtipos, IIa, IIx e IIb. As fibras do tipo IIb têm os mais baixos níveis de conteúdo mitocondrial e dependem do metabolismo glicolítico como fonte de energia sendo suscetíveis à fadiga, enquanto que os subtipos IIa e IIx possuem funções oxidativas e de contração intermediárias aos tipos I e IIb. O músculo sóleo é constituído principalmente de fibras do tipo I oxidativas (~37%) e IIa (~38%), enquanto o músculo gastrocnêmio é misto contendo tanto fibras do tipo I oxidativas em baixas quantidades (~5%), como também fibras dos subtipos IIa e IIx, sendo o subtipo IIb o predominante (~54%) (AUGUSTO; PADOVANI; CAMPOS, 2004). Estudos já demonstraram que o músculo esquelético adulto possui plasticidade e pode sofrer conversão entre os diferentes tipos de fibras em resposta ao treinamento físico ou em estados patológicos como na resistência à insulina e DM2 (GAN et al., 2013; SHORTREED et al., 2009; WANG et al., 2004). Dessa forma, explorar as diferenças entre os tipos de músculo esquelético, sóleo (oxidativo) e gastrocnêmio (glicolítico) se mostram interessantes no nosso modelo de RI.

Na **figura 7**, podemos notar que após oito semanas de dieta hiperlipídica, o músculo sóleo dos animais tiveram expressão reduzida do miR-1a (H:0,70±0,18 vs C:1,03±0,24, $p<0,05$), miR-133a (H:0,83±0,20 vs C:1,06±0,37, $p<0,05$) e miR-206 (H:0,68±0,22 vs C:1,02±0,22, $p<0,001$) em relação aos animais alimentados com dieta balanceada (C). O tratamento com fenofibrato reverteu a diminuição da expressão apenas do miR-1a no músculo sóleo de camundongos alimentados com DHL (HF:1,09±0,40 vs H:0,70±0,18, $p<0,05$). Não observamos alterações significativas na expressão dos miRs-133b, miR-208b, miR-499-5p e miR-223 no músculo sóleo dos animais.

Sóleo

Figura 7. Expressão dos miRNAs em músculo sóleo de camundongos alimentados com dieta balanceada (C) ou hiperlipídica (H) e tratados ou não com fenofibrato. *# $p < 0,05$: (*) vs C; (#) vs H, por análise multivariada *Two-Way ANOVA*. Valores representam média $\pm$ EPM com $n \pm 10$ animais.

No músculo gastrocnêmio observamos expressão reduzida do miR-1a (**Figura 8**) após oito semanas de dieta hiperlipídica. O tratamento com fenofibrato aumentou a expressão do miR-206 e do miR-499 nos animais que receberam dieta

hiperlipídica mesmo sem verificarmos alterações de expressão em relação ao grupo H quando comparado ao grupo C. Não observamos alterações significativas na expressão dos miRs-133a, miR-133b e miR-223 no músculo gastrocnêmio dos animais, sendo que o miR-208b não foi detectado.

Gastrocnêmio

Figura 8. Expressão dos miRNAs em músculo gastrocnêmio de camundongos alimentados com dieta balanceada (C) ou hiperlipídica (H) e tratados ou não com fenofibrato. *# $p < 0,05$: (*) vs C; (#) vs H, por análise multivariada *Two-Way* ANOVA. Valores representam média $\pm$ EPM com $n \pm 10$ animais.

Dessa forma, nossos resultados corroboram com os encontrados por Chen et al. (2012) que relataram expressão diminuída dos miRs-1, miR-133a, miR-133b e miR-206 em músculo gastrocnêmio de camundongos com resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica. Também já foram relatadas menor expressão dos miR-133a e miR-206 em biópsias de músculo vasto lateral de indivíduos com DM2

(GALLAGHER et al., 2010). Utilizando biópsias de músculo vasto lateral de indivíduos saudáveis, Granjon et al. (2009) mostraram que a expressão dos miR-1a e miR-133a diminuem após 3 h de clamp hiperinsulinêmico euglicêmico.

Nossos resultados indicam ainda, que o miR-1a no músculo sóleo e os miR-206 e miR-499 no gastrocnêmio possam estar sendo regulados pela ação do PPAR α , visto que o fenofibrato é um agonista desse receptor nuclear e o miR-1a tem sua expressão normalizada quando o fármaco é administrado e os miR-206 e miR-499 sua expressão aumentada. Ou ainda que o receptor nuclear pudesse ativar outros fatores ou cofatores de transcrição, os quais regulariam a expressão desses miRNAs. Os miRNAs, miR-1a e miR-206 possuem 18 de 21 nucleotídeos correspondentes em suas sequências e completa identidade nos primeiros oito nucleotídeos que constituem a região “seed” dessa forma partilhando o reconhecimento de diversos genes alvos (KIM et al., 2006).

Shortreed et al. (2009) demonstraram que camundongos alimentados com DHL apresentaram metabolismo oxidativo aumentado observado através do aumento percentual da proporção de fibras tipo IIa e redução do tipo IIb no músculo gastrocnêmio, aumento na área das fibras e maior atividade da enzima desidrogenase hidroxiacil-CoA de cadeia curta (SCHAD) no músculo sóleo, indicando aumento da β -oxidação de AGs como uma resposta adaptativa positiva inicial resultante da abundância de lipídeos derivados da dieta.

Apesar de Gan et al. (2013) terem mostrado a participação dos miRs-208b e miR-499-5p na programação das fibras tipo I, não encontramos diferenças significativas na expressão desses miRNAs em relação ao grupo H quando comparado ao grupo C nos músculos avaliados. No entanto, o aumento na expressão do miR-499 induzida por fenofibrato no músculo gastrocnêmio dos camundongos obesos poderia indicar uma maior proporção de fibras oxidativas.

4.6 Expressão de RNAm dos possíveis alvos dos miRNAs em músculo esquelético de camundongos

A via da β -oxidação de AGs através de genes relacionados com a regulação da biogênese, função e dinâmica enzimática mitocondrial, foi investigada. Selecionamos esta via por que os fibratos são ligantes de PPAR α , um receptor nuclear envolvido com a captação e oxidação de AGs, e também como descrito na

introdução, por alterações na oxidação de AGs provocada pelo excesso de AG livres encontrados nessas condições serem apontadas como o principal mecanismo de desenvolvimento de resistência à insulina muscular.

Após 8 semanas de dieta hiperlipídica, a expressão de RNAm dos genes dos transportadores *Fabp3* e *Cpt1b*, dos fatores de transcrição *Pgc1α* e *Esrrγ* e das enzimas *Acot2* e *Pdk4* aumentaram no músculo sóleo dos camundongos do grupo que recebeu DHL e o tratamento com fenofibrato impediu esse aumento deixando os níveis de expressão gênica similar ao dos animais alimentados apenas com dieta balanceada. O tratamento com fenofibrato dos animais alimentados com dieta hiperlipídica induziu uma diminuição da expressão de *Ucp3* e *Sod2* quando comparados aos que só receberam dieta. No entanto parece que o fenofibrato por si induz uma menor expressão de *Cpt1b*, *Ucp3* e *Sod2*, visto que os animais que receberam dieta balanceada e fenofibrato (CF) apresentaram diminuição da expressão quando comparados com os animais que receberam apenas dieta balanceada (C) (**Figura 9**). A expressão de *Irs1*, *Glut4*, *Pparaα* e *Pparaβ* não se alterou em nenhum tratamento.

Sóleo

Figura 9. Expressão de RNAm de possíveis alvos dos miRNAs relacionados com a biogênese e função mitocondrial no músculo sóleo de camundongos. Camundongos alimentados com dieta balanceada (C) ou hiperlipídica (H) e tratados ou não com fenofibrato. *# $p < 0,05$: (*) vs C; (#) vs H, por análise multivariada *Two-Way ANOVA*. Valores representam média $\pm$ EPM com $n \pm 10$ animais.

Assim sendo, nossos resultados corroboram com a hipótese de que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, à redução da sensibilidade à insulina no músculo esquelético oxidativo leva ao aumento da expressão de genes envolvidos com a oxidação de AGs, biogênese e função mitocondrial. Esses efeitos parecem ser mediados pela ativação de *Pgc1 α* que por sua vez ativa a transcrição de *Esrry* que como apontado na **figura 1**, está envolvido com o aumento da biogênese mitocondrial e da oxidação de ácidos graxos através de maior expressão dos transportadores de AGs, *Fabp3* e *Cpt1b*. O aumento da expressão da enzima *Acot2* sugere uma resposta de proteção do músculo contra a sobrecarga de ácidos graxos, como observado também em músculo sóleo de ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica (FUJITA et al., 2011).

A regulação da expressão do RNAm de *Pdk4* tem sido demonstrada em músculo esquelético de ratos e em humanos sob condições de jejum, alimentação

rica em gordura e diabetes (HOLNESS et al., 2000; WU P et al., 1999), sendo ambos os receptores nucleares *Esrry* e *Esrra* apontados como estimuladores da expressão de *Pdk4* ao se ligarem a sua região promotora, estímulo este que é inibido pela ação da insulina (ZHANG et al., 2006). Além disso, a ativação do PPAR α , conhecido por aumentar a oxidação de AGs, também conduziu à maior expressão do RNAm de *Pdk4* no coração (YOUNG et al., 2001).

O tratamento com fenofibrato e sua principal ação no fígado aumentando a β -oxidação de AGs nesse tecido, com consequente diminuição dos níveis plasmáticos de AGs livres no organismo, parece prevenir a sobrecarga lipídica no músculo esquelético o que pode ser observado através da expressão dos genes *Pgc1 α* , *Cpt1b*, *Esrry*, *Pdk4*, *Acot2* e *Fabp3* parecidas com a expressão encontrada nos animais controle que receberam dieta balanceada. E também pela redução da expressão dos genes *Ucp3* e *Sod2*, sinalizando que o tratamento com fenofibrato impediu o desacoplamento da cadeia de transporte de elétrons e o quadro de estresse oxidativo comumente observados em situações de resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica (HOEKS et al., 2006). Esses resultados em conjunto reforçam o efeito do fenofibrato na melhora da sensibilidade à insulina periférica e da captação de glicose do músculo esquelético oxidativo dos animais que receberam dieta hiperlipídica e tratados com fenofibrato.

Gastrocnêmio

Figura 10. Expressão de RNAm de possíveis alvos dos miRNAs relacionados com a biogênese e função mitocondrial no músculo gastrocnêmio de camundongos. Camundongos alimentados com dieta balanceada (C) ou hiperlipídica (H) e tratados ou não com fenofibrato. *# $p < 0,05$: (*) vs C; (#) vs H, por análise multivariada *Two-Way* ANOVA. Valores representam média $\pm$ EPM com $n \pm 5$ animais.

Já no músculo gastrocnêmio, apesar de verificarmos uma tendência de aumento de expressão dos genes *Cpt1b*, *Pgc1α* e *Esrry* no grupo H, esta não foi significativa, com exceção do *Esrry* após tratamento com fenofibrato nos animais que receberam dieta hiperlipídica em comparação aos que só receberam dieta. Possivelmente as alterações nesse músculo não foram tão pronunciadas como as observadas no músculo sóleo devido ao seu fenótipo de fibras musculares mistas (Figura 10).

4.7 Análise preditiva de possíveis alvos da ação do miR-1a

Uma vez observada a expressão diminuída do miR-1a em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, ao mesmo tempo em que a expressão de genes relacionados com a capacidade oxidativa mitocondrial se apresentaram aumentadas. E ainda, que o tratamento com fenofibrato impediu a diminuição da expressão do miR-1a, bem como a expressão exacerbada dos genes analisados no músculo sóleo de camundongos alimentados com DHL, verificamos através de

análise preditiva se as alterações observadas em nosso modelo poderiam ocorrer devido à interação direta entre a sequência “seed” do miR-1a com o elemento de reconhecimento do miRNA (MRE), localizado no RNAm de seus possíveis alvos.

```

3'  uauguaugaAGAAAUGUAAGGu 5'  mmu-miR-1a
      | | | | | | | |
97:5' agaaguuggUGUGAACAUUCCc 3'  Prkaa2

```

Figura 11. Predição de alvos do miR-1a. Análise realizada através do banco de dados microRNA.org.

Interessantemente, verificamos através da análise de predição, a complementariedade entre o miR-1a e o gene *Prkaa2*, que transcreve a proteína quinase ativada por AMP subunidade catalítica α -2 (AMPK α 2) (**Figura 11**).

Esta serina / treonina quinase é ativada quando os níveis de energia celular estão baixos (razão AMP:ATP alta) através da fosforilação em sua porção Thr172 e modificação alostérica da sua subunidade catalítica α . Através de sua ativação, cascatas de sinalização são ativadas a fim de aumentar processos catabólicos tais como a captação de glicose e oxidação de ácidos graxos, sendo assim considerada a principal enzima reguladora do metabolismo celular (COUGHLAN et al., 2016; ZHANG; ZHOU; LI, 2009).

No músculo esquelético, a ativação de AMPK causa um aumento na expressão de genes mitocondriais por ação via PGC-1 α (CANTÓ et al., 2009; JÄGER et al., 2007).

4.8 Expressão proteica dos alvos diretos e indiretos do miR-1a relacionados com a β -oxidação mitocondrial

Avaliamos a expressão proteica de pAMPK α , PGC1 α e CPT1B no músculo sóleo por *Western Blotting*.

Como esperado, a expressão da proteína AMPK α fosforilada em sua porção Thr172, representando a proteína ativada se encontrou aumentada no grupo que recebeu dieta hiperlipídica (H) representada na **figura 12**, confirmando a oxidação de ácidos graxos aumentada nesses animais. Verificamos também uma tendência parecida de aumento da expressão do transportador CPT1B, no grupo obeso (H) quando comparado ao grupo controle (C), mas sem diferença significativa. O tratamento com fenofibrato impediu o aumento da expressão proteica para pAMPK α

causada pela dieta hiperlipídica e provocou diminuição da expressão de CPT1B. O co-ativador de fatores de transcrição, PGC1 α , apresentou expressão proteica diminuída após tratamento com fenofibrato em ambos os grupos controle e hiperlipídico.

Utilizamos como normalizador da expressão proteica, a expressão da proteína GAPDH, que se mostrou estável entre os grupos, como apresentado na figura 12.

Figura 12. Expressão proteica dos possíveis alvos do miR-1a relacionados com a biogênese e função mitocondrial no músculo sóleo de camundongos. Camundongos alimentados com dieta balanceada (C) ou hiperlipídica (H) e tratados ou não com fenofibrato. *# p < 0,05: (*) vs C; (#) vs H, por análise multivariada *Two-Way ANOVA*. Valores representam média $\pm$ EPM com n $\pm$ 10 animais.

4.9 Atividades de enzimas chaves do metabolismo energético

Avaliamos a atividade enzimática de algumas enzimas chaves do processo da oxidação de ácidos graxos (AGs) (beta-hidroxiacil-CoA desidrogenase (β HAD)), da via glicolítica (hexoquinase, fosfofrutoquinase) e do ciclo de Krebs (citrato sintase) para melhor entendimento e confirmação das vias metabólicas ativadas no nosso modelo experimental de resistência à insulina.

Tabela 5. Atividade enzimática avaliada em camundongos alimentados com dieta balanceada (C) ou hiperlipídica (H) e tratados ou não com fenofibrato

	C	H	CF	HF
Citrato Sintase	1,0 $\pm$ 0,08	1,69 $\pm$ 0,13*	1,32 $\pm$ 0,15	1,45 $\pm$ 0,14
β-hidroxiacil-CoA desidrogenase	1,0 $\pm$ 0,19	1,82 $\pm$ 0,22*	1,78 $\pm$ 0,29	1,98 $\pm$ 0,24
Hexoquinase	1,0 $\pm$ 0,06	1,47 $\pm$ 0,12*	1,40 $\pm$ 0,14	1,24 $\pm$ 0,12
Fosfofrutoquinase	1,0 $\pm$ 0,25	0,56 $\pm$ 0,11	0,29 $\pm$ 0,09*	0,80 $\pm$ 0,15

Tratamento com fenofibrato (50 mg/Kg/dia) (CF e HF) ou com metilcelulose 0,5% (C e H) nas duas últimas semanas do protocolo experimental de 8 semanas de dieta. Resultados expressos em nmol/min x mg de proteína-1 (fold change). *# $p < 0,05$: (*) vs C; (#) vs H, por análise multivariada *Two-Way* ANOVA. Valores representam média $\pm$ EPM com $n \geq 10$ animais.

Após alimentação com dieta hiperlipídica, as atividades da citrato sintase (CS) e β HAD foram aumentadas (**Tabela 5**) indicando uma maior oxidação de ácidos graxos e atividade mitocondrial e, portanto maior formação de acetil-CoA e logo citrato. O citrato é um efetuator alostérico negativo da fosfofrutoquinase (PFK) e quando aumenta seus níveis no músculo, ocorre inibição da PFK. Não verificamos diferenças estatísticas em relação à atividade da enzima PFK pela alimentação com dieta hiperlipídica, apesar de observarmos uma tendência de decaimento. Como esperado a atividade da hexoquinase foi aumentada, já que a concentração do seu inibidor alostérico, glicose-6-fosfato deve estar diminuída nos animais, pois eles têm menor captação de glicose no músculo esquelético como demonstrado anteriormente na **figura 6**.

O tratamento com fenofibrato não reverteu os efeitos da dieta nas atividades enzimáticas e conforme esperado a beta-oxidação de AGs continua alta nos animais alimentados com dieta hiperlipídica. No entanto a oxidação de glicose parece estar

melhorada, como visto no experimento de metabolismo de glicose em resposta à insulina em músculo sóleo isolado e na tendência de reversão na atividade da enzima PFK (não estatística).

4.10 Análises de correlação

A fim de correlacionarmos a expressão do miR-1a, fizemos análises de correlação de Spearman entre todos os genes avaliados e a expressão do miR-1a. Na **figura 13** apresentamos apenas as correlações significativas entre a expressão de RNAm e o miR-1a. Corroborando com nossos dados até o momento, a expressão do miR-1a se correlaciona negativamente com a expressão de *Cpt1b*, e positivamente com a expressão de *Pgc1α*, *Esrry* e *Pdk4* (**Figura 13**).

Figura 13. Correlações significativas entre o miR-1a e a expressão de RNAm dos genes da via de biogênese mitocondrial e metabolismo de AGs e glicose. As correlações foram significativas com $p < 0,0001$. Nos gráficos é mostrado o coeficiente r de Spearman.

O próximo passo foi, então, fazer a validação dos resultados através da utilização de inibidores (anti-miRs) e mimetizadores do miR-1a em linhagem celular de camundongos C2C12.

4.11 Análise funcional do miR-1a

Por fim, confirmamos o envolvimento do miR-1a com a regulação dos genes e proteínas relacionados com a oxidação de AGs e a resistência à insulina através de análise funcional com inibidores (antogomirs) ou mimetizadores de miR-1a em linhagem celular de camundongos C2C12 (ATCC no: CRL-1772), a qual é modelo de músculo esquelético. Como mostrado anteriormente, selecionamos o miR-1a especificamente, devido aos resultados encontrados de expressão reduzida nos camundongos que receberam dieta hiperlipídica por 8 semanas e restauração dessa expressão quando tratados com fenofibrato sugerindo seu possível envolvimento na regulação desta via.

Antes de iniciarmos as transfecções, padronizamos no nosso laboratório a indução de resistência à insulina nas células C2C12 com ácido palmítico 0,75 mM. Para avaliar a sensibilidade à insulina quantificamos a expressão proteica de AKT e p-AKT, pois a menor fosforilação de AKT é um indício de que a via de sinalização da insulina está diminuída. Como apresentado na **figura 14**, após estímulo com insulina a 7 nM por 15 min, as células tratadas com ácido palmítico apresentaram menor fosforilação da AKT, indicando uma menor sensibilidade à insulina.

Figura 14. Padronização da indução de resistência à insulina na linhagem celular C2C12 avaliada através da fosforilação de Akt em serina 473. * $p < 0,05$: (*) vs C na presença de insulina à 7nM, por análise multivariada *Two-Way* ANOVA. Valores representam média $\pm$ EPM com $n=2$, sendo cada experimento realizado em triplicata/grupo.

A seguir, as células C2C12 foram transfectadas com 1 nM de mimetizador do miR-1a (mimic miR-1a), 10 nM de inibidor do miR-1a (inibidor miR-1a) ou seu controle de transfecção específico “scramble” (grupo C) com o reagente interferim. Após 48h da transfecção, as células foram coletadas para extração de RNA total e proteínas onde quantificamos a expressão do miR-1a afim de verificarmos a eficiência da transfecção e a expressão da proteína quinase ativada por AMP subunidade catalítica α -2 (AMPK α 2), transcrita pelo gene *Prkaa2*, alvo predito do miR-1a.

Como apresentado na **figura 15**, o agente mimético aumentou a expressão de miR-1a e o inibidor diminuiu a quantidade desse miRNA nas células C2C12 quando comparada ao grupo C, caracterizando o sucesso da transfecção.

Figura 15. Expressão do miR-1a em células C2C12 transfectadas com controle “scramble” (C) e padronização da transfecção com agente mimético (ganho de função; mimic miR-1a) ou inibidores do miR-1a (perda de função). *# $p < 0,05$: (*) vs C, (#) vs mimic miR-1a, por análise multivariada *One-Way ANOVA* e *Student t-test*. Valores representam média $\pm$ EPM com $n=2$, sendo cada experimento realizado em triplicata/grupo.

Já ao analisarmos a expressão da proteína AMPK α , através da técnica de western blotting, verificamos que o agente mimético do miR-1a transfectado nas células C2C12 provocou por si só o aumento da expressão proteica de AMPK α , enquanto que, a inibição do miR-1a nas células C2C12 provocou o efeito oposto ao do mimetizador, assim diminuindo a expressão da proteína AMPK α (**figura 16**).

Dessa forma, o ensaio funcional de ganho e perda de função corrobora com a possibilidade de ação do miR-1a, estimulando ao invés de reprimindo a expressão do seu alvo predito, AMPK α e dessa forma estimulando a β -oxidação de AGs.

Esta nova função atribuída aos miRNAs vem sendo reportada em estudos crescentes, que demonstram que os miRNAs e suas micro ribonucleoproteínas (microRNPs) podem desencadear funções alternativas que permitam a estimulação da expressão gênica, além das suas funções repressivas em determinadas condições celulares, como em diferentes períodos de maturação celular (LEE; VASUDEVAN, 2013).

Figura 16. Expressão da proteína AMPK α em células C2C12 transfectadas com controle “scramble” (C), com agente mimético (mimic miR-1a) ou inibidor do miR-1a. *# p<0,05: (*) vs C, (#) vs mimic miR-1a por análise multivariada *One-Way* ANOVA. Valores representam média $\pm$ EPM com n=2, sendo cada experimento realizado em triplicata/grupo.

Com as condições ideais de transfecção e indução de resistência à insulina estabelecidas, além dos resultados de expressão da proteína quinase ativada por AMP subunidade catalítica α (AMPK α), transcrita pelo gene *Prkaa*, seu alvo predito, resolvemos verificar o efeito do ganho/perda de função do miR-1a na expressão de RNAm para *Cpt1b*, *Pgc1 α* , *Esrry*, genes da via de oxidação de AGs, uma vez que no músculo esquelético, a ativação de AMPK α estimula a expressão de genes mitocondriais por ação via PGC-1 α (CANTÓ et al., 2009; JÄGER et al., 2007). Avaliamos também a expressão de Pdk4, que uma vez ativado, impede a ação do

complexo piruvato desidrogenase (PDH), responsável pela descarboxilação oxidativa de piruvato a acetil-CoA na via glicolítica. Outra razão para a análise desses genes se refere à correlação com a expressão do miR-1a nos experimentos *in vivo* representados na **figura 13**.

Figura 17. Expressão de genes relacionados à biogênese mitocondrial (*Pgc1α*, *Esrry*), metabolismo de AGs (*Cpt1b*) e glicose (*Pdk4*) ativados via AMPK, em células C2C12. Células transfectadas com controle “scramble” (C), transfectadas com mimic miR-1a ou inibidor do miR-1a. * $p < 0,05$: (*) vs C, por análise multivariada One-Way ANOVA. Valores representam média $\pm$ EPM com $n=2$, sendo cada experimento realizado em triplicata/grupo.

Observamos que o tratamento das células musculares com o agente mimetizador do miR-1 provocou uma tendência de aumento na expressão de *Pgc1α*, enquanto que o agente inibitório parece provocar o efeito oposto (**figura 17**), mas esses resultados não foram estatisticamente significativos uma vez que o número de experimentos foi baixo.

Uma vez que o tratamento com fenofibrato nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica provocou efeitos positivos na sensibilidade à insulina e no metabolismo da glicose no músculo esquelético, juntamente com a reversão da

expressão diminuída do miR-1a ocasionada pela dieta nesses animais, acreditamos que o fenofibrato exerça suas ações no metabolismo muscular via miR-1a. Fomos então avaliar qual o efeito do ganho/perda de função desse miRNA nas células C2C12 com resistência à insulina induzida pelo ácido palmítico. Como descrito em detalhes em *Materiais e Métodos*, as células C2C12 foram transfectadas com o mimic ou inibidor quando atingiram 50-70% de confluência. Após 18h de transfecção, o meio foi trocado por meio de diferenciação e as células foram incubadas por 30 h. Por fim, foi realizada a indução da resistência à insulina com palmitato. Ao fim do protocolo, as células foram coletadas para extração de RNA total e proteínas para verificação da expressão dos genes *Cpt1b*, *Pgc1α*, *Esrry* e *Pdk4*, da proteína p-AKT a fim de verificar se a indução ou inibição do miR-1a acarretou alterações na sinalização da insulina.

Figura 18. Expressão de genes relacionados à biogênese mitocondrial (*Pgc1α*, *Esrry*), metabolismo de AGs (*Cpt1b*) e glicose (*Pdk4*) ativados via AMPK, em células C2C12 com resistência à insulina. Células transfectadas com controle “scramble” sem ácido palmítico (C) e com (P), transfectadas com mimic miR-1a tratadas com ácido palmítico (mimic P) ou inibidor do miR-1a tratada com ácido palmítico (inib P). *# $p < 0,05$: (*) vs C, (#) vs P, por análise multivariada *One-Way* ANOVA. Valores representam média $\pm$ EPM com $n=3$ para C vs P, $n=2$ para mimic miR-1a e $n=1$ para inibidor miR-1a, sendo cada experimento realizado em triplicata/grupo.

Na **figura 18** estão representados os resultados obtidos de quantificação da expressão de RNAm dos genes avaliados. O tratamento com ácido palmítico diminuiu significativamente a expressão de RNAm dos genes *Cpt1b*, *Esrry* e *Pdk4*, com uma tendência parecida mas não significativa na expressão de *Pgc1α*. Por sua vez, o aumento da expressão de miR-1a através do agente mimético impediu totalmente a ação do palmitato de diminuição na expressão de *Cpt1b*. O tratamento das células com o mimetizador de miR-1a também demonstrou uma tendência de proteção do decaimento da expressão de *Pgc1α* e *Esrry*, e possivelmente, uma piora na ação de decaimento ocasionada pelo palmitato quando transfectadas com o agente inibitório do miR-1a, mas esses resultados não foram estatisticamente significativos.

Dessa forma, as células C2C12 de músculo esquelético com resistência à insulina induzida pelo tratamento com ácido palmítico, apresentaram expressão diminuída dos genes *Cpt1b*, *Esrry*, *Pdk4*, *Pgc1α* quando comparados ao grupo C, manifestando resultados exatamente opostos aos resultados obtidos nos experimentos “*in vivo*” em camundongos com resistência à insulina induzida pela dieta hiperlipídica, onde a expressão desses mesmos genes se mostrou aumentada. Acreditamos que isso se deve ao fato de o tratamento com ácidos graxos saturados de cadeia longa, como é o caso do ácido palmítico, conhecido por induzir resistência à insulina (GRIFFIN et al., 1999; YUZEFOVYCH; WILSON; RACHEK, 2010), ocorre de um modo mais agudo e acentuado quando comparado ao processo gradativo ocasionado pela dieta hiperlipídica. Assim sendo, a resistência à insulina induzida pelo ácido palmítico seria comparada aos estudos em camundongos em que o tempo de dieta hiperlipídica é estendido, do qual é observada uma menor capacidade oxidativa mitocondrial com acúmulo de intermediários lipídicos e processamento da glicose prejudicado (PINEL et al., 2016).

Uma vez que a transfecção do miR-1a foi realizada nas células C2C12 indiferenciadas e depois da transfecção a diferenciamos somente por um período curto para indução da resistência à insulina, nossos experimentos foram conduzidos em um período de diferenciação incompleta, ou seja, ainda em andamento das células C2C12.

Estudos recentes mostram a função do miR-1a promovendo a diferenciação muscular e alterações na expressão desse miRNA estão associados a desordens do

músculo esquelético (CHEN et al., 2006; GOLJANEK-WHYSALL et al., 2012). mitochondrial

Como proposto por Zhang et al. (2014), o miR-1 músculo específico é induzido durante a miogênese e com auxílio da micro ribonucleoproteína Ago2, é capaz de estimular, ao invés de reprimir, a transcrição das proteínas mitocondriais ND1 do complexo enzimático I e COX-1 do complexo IV da cadeia respiratória, ao mesmo tempo que a atividade respiratória e produção de ATP se encontraram aumentadas para atender a crescente demanda de energia do processo de diferenciação nos mioblastos.

Por esse motivo, acreditamos que no nosso modelo de transfecção do miR-1a em células indiferenciadas, o miR-1a esteja regulando positivamente a expressão da proteína AMPK α colaborando com o aumento da produção de ATP necessário para diferenciação dos mioblastos em miotubos. Sendo assim, novos experimentos onde a transfecção dos miRNAs é realizada em células C2C12 diferenciadas se fazem necessários, a fim de verificar os resultados de ganho e perda da função do miR-1 sem a influência do processo de miogênese.

Por fim, verificamos se a sensibilidade à insulina seria revertida nas células C2C12 pela superexpressão do miR-1a. Colaborando com nossos resultados anteriores, ao aumentarmos a expressão de miR-1a, obtivemos uma tendência de aumento da fosforilação de AKT na presença de insulina (dados não significativos), o que indica que as células possam estar com sensibilidade à insulina aumentada, mas uma vez que temos somente um experimento realizado, também faz-se necessário a expansão desses resultados em células diferenciadas.

Figura 19. Expressão de p-AKT em células C2C12 transfectadas com controle “scramble” sem ácido palmítico (C) e com (P) e com mimic miR-1a tratadas com ácido

palmitico (mimic P). * $p < 0,05$: (*) vs C, por teste “t” de Student. Valores representam média $\pm$ EPM com $n=1$, sendo cada experimento realizado em triplicata/grupo.

Dessa forma nossos resultados propõem que o músculo esquelético oxidativo responde a intervenção com dieta hiperlipídica nas fases iniciais da RI com uma resposta adaptativa positiva no nível mitocondrial, sendo esta uma resposta potencialmente compensatória a elevada disponibilidade de AGs nesses camundongos, como proposto por (TURNER et al., 2007).

O excesso de lipídeos da dieta leva a esteatose do fígado e ao aumento do triglicerídeo (TG) no plasma. O aumento da expressão do transportador FABP3 permite uma maior entrada de triglicerídeos no músculo esquelético oxidativo. O estresse causado na célula pelo aumento de lipídeos intracelulares aumenta a razão AMP:ATP, o que ativa a AMPK pela fosforilação em sua porção treonina172 (HARDIE, 2007; KAHN et al., 2005; LEE; KIM, 2010). A p-AMPK resulta em ativação do co-ativador 1 α do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC1 α), induzindo a transcrição de genes mitocondriais ocasionando o aumento da β -oxidação mitocondrial de AGs observada através da maior atividade das enzimas CS e β -HAD, e com consequente diminuição do metabolismo da glicose observada através da inibição do complexo enzimático PDH pela maior expressão do gene da Pdk4, corroborando com a teoria de competição entre substratos, proposta por (RANDLE et al., 1963).

Figura 20. Esquema representativo do desenvolvimento da resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica em músculo sóleo de camundongos C57BL/6 e a ação regulatório dos miRNAs.

Por fim, as alterações observadas parecem estar correlacionadas com uma expressão diminuída dos miRNAs músculo-específicos (miR-1a, miR-133a e miR-206) que parecem orquestrar estes efeitos mitocondriais em conjunto.

O tratamento com fenofibrato e sua principal ação como agonista dos receptores nucleares PPAR α aumentando a oxidação de AGs no fígado com consequente diminuição dos triglicerídeos plasmáticos no organismo, parece diminuir a sobrecarga lipídica no músculo esquelético. Uma vez que o tratamento com fenofibrato nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica provocou alterações benéficas melhorando a sensibilidade à insulina periférica e no músculo através de melhora da captação de glicose, juntamente com a reversão da expressão diminuída do miR-1a ocasionada pela dieta nesses animais, acreditamos que o fenofibrato exerça suas ações no metabolismo muscular via miR-1a, regulando seu alvo predito, o gene *Prkaa2*, que transcreve a proteína AMPK α 2, considerada a principal enzima reguladora do metabolismo celular. No entanto, o músculo esquelético do animal tratado com fenofibrato ainda tem preferência em oxidar AGs ao invés de glicose como podemos observar pela atividade alta da β HAD e diminuída da PFK, tanto nos animais alimentados com dieta controle como hiperlipídica e tratados com fenofibrato, uma vez que os receptores PPAR α também são expressos em grandes quantidades no músculo.

Figura 21. Esquema representativo do efeito do tratamento com fenofibrato no desenvolvimento da resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica em músculo sóleo de camundongos C57BL/6 e a ação regulatória do miR-1a nesta via.

Os ensaios de ganho e perda de função realizados nas células C2C12 por sua vez representam um modelo de resistência à insulina induzida pelo tratamento com ácido palmítico mais agudo e acentuado, do qual é observada uma menor capacidade oxidativa mitocondrial. Por sua vez essa diminuição da biogênese e função mitocondrial observadas nas células resistentes à insulina é revertida via tratamento com mimetizadores do miR-1a e sua ação estimulando, ao invés de reprimindo, seu alvo predito, o gene *Prkaa2*, que transcreve a proteína quinase AMPK α 2, que por fim, parece melhorar a fosforilação da AKT nessas células, resultado este que ainda deve ser realizado em células C2C12 diferenciadas.

O grande espectro de atividades da AMPK no metabolismo lipídico e da glicose faz com que esta seja um alvo muito atraente. Juntamente com relatos de que a AMPK é ativada no músculo em resposta ao exercício físico (LONG; ZIERATH, 2006; REZNICK; SHULMAN, 2006) ocasionando efeitos positivos no metabolismo como um todo, nossos resultados nos levam a um intenso interesse em desvendar se no futuro, o miR-1a serviria como um potencial alvo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento do DM2 e alterações metabólicas associadas.

5 CONCLUSÃO

O quadro de resistência à insulina foi induzido nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, tanto de forma sistêmica quanto periféricamente no músculo esquelético. E o fenofibrato se mostrou parcialmente eficaz na reversão da resistência à insulina induzida pela dieta hiperlipídica nesses animais. Verificamos isso através das alterações encontradas em parâmetros sorológicos, metabólicos, enzimáticos e de genes e proteínas envolvidas na via de biogênese mitocondrial e metabolismo de AGs e glicose. Essas alterações benéficas provocadas pelo tratamento com fenofibrato, no músculo esquelético oxidativo parecem ser mediadas pela ação do miR-1a regulando seu alvo predito, o gene *Prkaa2*, que transcreve a proteína AMPK α 2.

O aumento na transcrição e consequente fosforilação de AMPK α 2, isoforma predominante no músculo esquelético, ativa processos catabólicos tais como a captação de glicose e oxidação de ácidos graxos, sendo assim considerada a principal enzima reguladora do metabolismo celular ao estimular a expressão de genes mitocondriais por ação via PGC-1 α .

REFERÊNCIAS*

ALP, P. R.; NEWSHOLME, E. A.; ZAMMIT, V. A. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **Biochem J**, v. 154, n. 3, p. 689-700, Mar 1976. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8036> >.

ANDREYEV, A. Y.; KUSHNAREVA, Y. E.; STARKOV, A. A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Biochemistry (Mosc)**, v. 70, n. 2, p. 200-214, Feb 2005. ISSN 0006-2979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15807660> >.

AUGUSTO, V.; PADOVANI, C. R.; CAMPOS, G. E. R. Skeletal muscle fiber types in C57BL6J mice. **Braz. J. Morphol. Sci**, v. 2, n. 21, p. 89-94, 2004. ISSN- 0102-9010. Disponível em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.470.4709&rep=rep1&type=pdf>.

BERTHOU, L. et al. Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice. **J Clin Invest**, v. 97, n. 11, p. 2408-2416, Jun 1996. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8647932> >.

BLOCH-DAMTI, A.; BASHAN, N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, n. 11-12, p. 1553-1567, 2005 Nov-Dec 2005. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16356119> >.

BODEN, G. Effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis. **Life Sci**, v. 72, n. 9, p. 977-988, Jan 2003. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12495777> >.

BONNARD, C. et al. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. **J Clin Invest**, v. 118, n. 2, p. 789-800, Feb 2008. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18188455> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BRENNECKE, J. et al. Principles of microRNA-target recognition. **PLoS Biol**, v. 3, n. 3, p. e85, Mar 2005. ISSN 1545-7885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15723116> >.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRUCE, K. D.; HANSON, M. A. The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome. **J Nutr**, v. 140, n. 3, p. 648-652, Mar 2010. ISSN 1541-6100. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20107145>>.

BUETTNER, R.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity (Silver Spring)**, v. 15, n. 4, p. 798-808, Apr 2007. ISSN 1930-7381. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426312>>.

CANTÓ, C. et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. **Nature**, v. 458, n. 7241, p. 1056-1060, Apr 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19262508>>.

CAREY, V. J. et al. Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study. **Am J Epidemiol**, v. 145, n. 7, p. 614-619, Apr 1997. ISSN 0002-9262. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9098178>>.

CHALLISS, R. A. et al. Effects of the beta-adrenoceptor agonist isoprenaline on insulin-sensitivity in soleus muscle of the rat. **Biochem J**, v. 233, n. 2, p. 377-381, Jan 1986. ISSN 0264-6021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3513763>>.

CHAPUT, E. et al. Fenofibrate and rosiglitazone lower serum triglycerides with opposing effects on body weight. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 271, n. 2, p. 445-450, May 2000. ISSN 0006-291X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10799317>>.

CHAVEZ, J. A. et al. Acid ceramidase overexpression prevents the inhibitory effects of saturated fatty acids on insulin signaling. **J Biol Chem**, v. 280, n. 20, p. 20148-20153, May 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15774472>>.

CHEN, C. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. 20, p. e179, 2005. ISSN 1362-4962. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16314309>>.

CHEN, G. Q. et al. Altered microRNA expression in skeletal muscle results from high-fat diet-induced insulin resistance in mice. **Mol Med Rep**, v. 5, n. 5, p. 1362-1368, May 2012. ISSN 1791-3004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22395471>>.

CHEN, J. F. et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. **Nat Genet**, v. 38, n. 2, p. 228-233, Feb 2006. ISSN 1061-4036. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16380711>>.

CHENG, Z.; ALMEIDA, F. A. Mitochondrial alteration in type 2 diabetes and obesity: an epigenetic link. **Cell Cycle**, v. 13, n. 6, p. 890-897, 2014. ISSN 1551-4005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24552811>>.

CHENG, Z.; RISTOW, M. Mitochondria and metabolic homeostasis. **Antioxid Redox Signal**, v. 19, n. 3, p. 240-242, Jul 2013. ISSN 1557-7716. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432475>>.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, v. 162, n. 1, p. 156-159, Apr 1987. ISSN 0003-2697. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2440339>>.

COUGHLAN, K. A. et al. PKD1 Inhibits AMPK α 2 through Phosphorylation of Serine 491 and Impairs Insulin Signaling in Skeletal Muscle Cells. **J Biol Chem**, Jan 2016. ISSN 1083-351X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26797128>>.

CRABTREE, B.; HIGGINS, S. J.; NEWSHOLME, E. A. The activities of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxylase and fructose diphosphatase in muscles from vertebrates and invertebrates. **Biochem J**, v. 130, n. 2, p. 391-396, Nov 1972. ISSN 0264-6021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4354325>>.

CRETTAZ, M. et al. Insulin resistance in soleus muscle from obese Zucker rats. Involvement of several defective sites. **Biochem J**, v. 186, n. 2, p. 525-534, Feb 1980. ISSN 0264-6021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6990920>>.

DAUGAARD, J. R. et al. Fiber type-specific expression of GLUT4 in human skeletal muscle: influence of exercise training. **Diabetes**, v. 49, n. 7, p. 1092-1095, Jul 2000. ISSN 0012-1797. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10909963>>.

DESERGNE, B. et al. The peroxisome proliferator-activated receptors at the cross-road of diet and hormonal signalling. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 65, n. 1-6, p. 65-74, Apr 1998. ISSN 0960-0760. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9699859>>.

DUURSMA, A. M. et al. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. **RNA**, v. 14, n. 5, p. 872-877, May 2008. ISSN 1469-9001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18367714>>.

ENDO, K. et al. Classification of various muscular tissues using miRNA profiling. **Biomed Res**, v. 34, n. 6, p. 289-299, 2013. ISSN 1880-313X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24389405>>.

ENGEL, P. C.; JONES, J. B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD⁺ in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. **Anal Biochem**, v. 88, n. 2, p. 475-484, Aug 1978. ISSN 0003-2697. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29519>>.

ESPINAL, J.; DOHM, G. L.; NEWSHOLME, E. A. Sensitivity to insulin of glycolysis and glycogen synthesis of isolated soleus-muscle strips from sedentary, exercised

and exercise-trained rats. **Biochem J**, v. 212, n. 2, p. 453-458, May 1983. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6349619> >.

EVANS, R. M.; BARISH, G. D.; WANG, Y. X. PPARs and the complex journey to obesity. **Nat Med**, v. 10, n. 4, p. 355-361, Apr 2004. ISSN 1078-8956. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15057233> >.

FINCK, B. N. et al. A potential link between muscle peroxisome proliferator- activated receptor-alpha signaling and obesity-related diabetes. **Cell Metab**, v. 1, n. 2, p. 133-144, Feb 2005. ISSN 1550-4131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054054> >.

FUJITA, M. et al. Upregulation of fatty acyl-CoA thioesterases in the heart and skeletal muscle of rats fed a high-fat diet. **Biol Pharm Bull**, v. 34, n. 1, p. 87-91, 2011. ISSN 1347-5215. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21212523> >.

GALLAGHER, I. J. et al. Integration of microRNA changes in vivo identifies novel molecular features of muscle insulin resistance in type 2 diabetes. **Genome Med**, v. 2, n. 2, p. 9, 2010. ISSN 1756-994X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20353613> >.

GAN, Z. et al. The nuclear receptor PPAR β/δ programs muscle glucose metabolism in cooperation with AMPK and MEF2. **Genes Dev**, v. 25, n. 24, p. 2619-2630, Dec 2011. ISSN 1549-5477. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22135324> >.

_____. Nuclear receptor/microRNA circuitry links muscle fiber type to energy metabolism. **J Clin Invest**, v. 123, n. 6, p. 2564-2575, Jun 2013. ISSN 1558-8238. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23676496> >.

GEORGANTAS, R. W. et al. Inhibition of myogenic microRNAs 1, 133, and 206 by inflammatory cytokines links inflammation and muscle degeneration in adult inflammatory myopathies. **Arthritis Rheumatol**, v. 66, n. 4, p. 1022-1033, Apr 2014. ISSN 2326-5205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24757153> >.

GOLJANEK-WHYSALL, K. et al. Regulation of multiple target genes by miR-1 and miR-206 is pivotal for C2C12 myoblast differentiation. **J Cell Sci**, v. 125, n. Pt 15, p. 3590-3600, Aug 2012. ISSN 1477-9137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22595520> >.

GRANJON, A. et al. The microRNA signature in response to insulin reveals its implication in the transcriptional action of insulin in human skeletal muscle and the role of a sterol regulatory element-binding protein-1c/myocyte enhancer factor 2C pathway. **Diabetes**, v. 58, n. 11, p. 2555-2564, Nov 2009. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19720801> >.

GRIFFIN, M. E. et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling

cascade. **Diabetes**, v. 48, n. 6, p. 1270-1274, Jun 1999. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10342815> >.

GUERRE-MILLO, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. **J Biol Chem**, v. 275, n. 22, p. 16638-16642, Jun 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10828060> >.

HANCOCK, C. R. et al. High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 22, p. 7815-7820, Jun 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18509063> >.

HARDIE, D. G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 10, p. 774-785, Oct 2007. ISSN 1471-0080. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17712357> >.

HENGARTNER, H.; HARRIS, J. I. Purification by affinity chromatography, properties and crystallisation of phosphofructokinase from thermophilic micro-organisms. **FEBS Lett**, v. 55, n. 1, p. 282-285, Jul 1975. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/124670> >.

HIRABARA, S. M.; CURI, R.; MAECHLER, P. Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. **J Cell Physiol**, v. 222, n. 1, p. 187-194, Jan 2010. ISSN 1097-4652. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19780047> >.

HITACHI, K.; TSUCHIDA, K. Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. **Front Physiol**, v. 4, p. 408, 2013. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24474938> >.

HOEKS, J. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and insulin resistance: acute effect of fatty acids. **Diabetologia**, v. 49, n. 10, p. 2419-2426, Oct 2006. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16896940> >.

HOLNESS, M. J. et al. Targeted upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK)-4 in slow-twitch skeletal muscle underlies the stable modification of the regulatory characteristics of PDK induced by high-fat feeding. **Diabetes**, v. 49, n. 5, p. 775-781, May 2000. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10905486> >.

HULVER, M. W. et al. Skeletal muscle lipid metabolism with obesity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 284, n. 4, p. E741-747, Apr 2003. ISSN 0193-1849. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626325> >.

HUSS, J. M.; KELLY, D. P. Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. **Circ Res**, v. 95, n. 6, p. 568-578, Sep 2004. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15375023> >.

INDO, H. P. et al. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. **Mitochondrion**, v. 7, n. 1-2, p. 106-118, 2007 Feb-Apr 2007. ISSN 1567-7249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17307400> >.

JÄGER, S. et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 29, p. 12017-12022, Jul 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17609368> >.

KAHN, B. B. et al. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. **Cell Metab**, v. 1, n. 1, p. 15-25, Jan 2005. ISSN 1550-4131. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054041> >.

KIM, H. K. et al. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. **J Cell Biol**, v. 174, n. 5, p. 677-687, Aug 2006. ISSN 0021-9525. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923828> >.

KRAEGEN, E. W.; COONEY, G. J. Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance. **Curr Opin Lipidol**, v. 19, n. 3, p. 235-241, Jun 2008. ISSN 0957-9672. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18460913> >.

LEE, S.; VASUDEVAN, S. Post-transcriptional stimulation of gene expression by microRNAs. **Adv Exp Med Biol**, v. 768, p. 97-126, 2013. ISSN 0065-2598. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23224967> >.

LEE, W. H.; KIM, S. G. AMPK-Dependent Metabolic Regulation by PPAR Agonists. **PPAR Res**, v. 2010, 2010. ISSN 1687-4765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20814441> >.

LEE, Y. S.; DUTTA, A. MicroRNAs in cancer. **Annu Rev Pathol**, v. 4, p. 199-227, 2009. ISSN 1553-4014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18817506> >.

LEIGHTON, B. et al. The effect of prostaglandins E1, E2 and F2 α and indomethacin on the sensitivity of glycolysis and glycogen synthesis to insulin in stripped soleus muscles of the rat. **Biochem J**, v. 227, n. 1, p. 337-340, Apr 1985. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3888199> >.

LIANG, Y. et al. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. **BMC Genomics**, v. 8, p. 166, 2007. ISSN 1471-2164. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17565689> >.

LIN, J.; HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. **Cell Metab**, v. 1, n. 6, p. 361-370, Jun 2005. ISSN 1550-4131. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054085> >.

LIPINA, C. et al. Mitochondrial substrate availability and its role in lipid-induced insulin resistance and proinflammatory signaling in skeletal muscle. **Diabetes**, v. 62,

n. 10, p. 3426-3436, Oct 2013. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23733201> >.

LIU, X. et al. ABCD2 alters peroxisome proliferator-activated receptor α signaling in vitro, but does not impair responses to fenofibrate therapy in a mouse model of diet-induced obesity. **Mol Pharmacol**, v. 86, n. 5, p. 505-513, Nov 2014. ISSN 1521-0111. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25123288> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

LONG, Y. C.; ZIERATH, J. R. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. **J Clin Invest**, v. 116, n. 7, p. 1776-1783, Jul 2006. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16823475> >.

LU, H.; BUCHAN, R. J.; COOK, S. A. MicroRNA-223 regulates Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism. **Cardiovasc Res**, v. 86, n. 3, p. 410-420, Jun 2010. ISSN 1755-3245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080987> >.

LUQUET, S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. **FASEB J**, v. 17, n. 15, p. 2299-2301, Dec 2003. ISSN 1530-6860. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14525942> >.

LYNEN, F. Lipide metabolism. **Annu Rev Biochem**, v. 24, p. 653-688, 1955. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13249368> >.

MANCINI, F. P. et al. Fenofibrate prevents and reduces body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats. **FEBS Lett**, v. 491, n. 1-2, p. 154-158, Feb 2001. ISSN 0014-5793. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11226439> >.

MARTIN, G. et al. Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. **J Biol Chem**, v. 272, n. 45, p. 28210-28217, Nov 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353271> >.

MARTINS, A. R. et al. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. **Lipids Health Dis**, v. 11, p. 30, 2012. ISSN 1476-511X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22360800> >.

MCCARTHY, J. J. microRNA and skeletal muscle function: novel potential roles in exercise, diseases, and aging. **Front Physiol**, v. 5, p. 290, 2014. ISSN 1664-042X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25132822> >.

MCGUIGAN, K.; PHILLIPS, P. C.; POSTLETHWAIT, J. H. Evolution of sarcomeric myosin heavy chain genes: evidence from fish. **Mol Biol Evol**, v. 21, n. 6, p. 1042-1056, Jun 2004. ISSN 0737-4038. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15014174>>.

MONTAGNER, A. et al. New insights into the role of PPARs. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 85, n. 5, p. 235-243, Nov 2011. ISSN 1532-2823. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21778043>>.

MUOIO, D. M.; KOVES, T. R. Skeletal muscle adaptation to fatty acid depends on coordinated actions of the PPARs and PGC1 alpha: implications for metabolic disease. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 32, n. 5, p. 874-883, Oct 2007. ISSN 1715-5312. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18059612>>.

MUOIO, D. M.; NEUFER, P. D. Lipid-induced mitochondrial stress and insulin action in muscle. **Cell Metab**, v. 15, n. 5, p. 595-605, May 2012. ISSN 1932-7420. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22560212>>.

NIELSEN, S. et al. Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. **J Physiol**, v. 588, n. Pt 20, p. 4029-4037, Oct 2010. ISSN 1469-7793. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20724368>>.

OAKES, N. D. et al. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. **Diabetes**, v. 46, n. 11, p. 1768-1774, Nov 1997. ISSN 0012-1797. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9356024>>.

PINEL, A. et al. N-3PUFA differentially modulate palmitate-induced lipotoxicity through alterations of its metabolism in C2C12 muscle cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1861, n. 1, p. 12-20, Jan 2016. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26477381>>.

PUIGSERVER, P. et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 829-839, Mar 1998. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529258>>.

RANDLE, P. J. et al. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, v. 1, n. 7285, p. 785-789, Apr 1963. ISSN 0140-6736. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13990765>>.

RASMUSSEN, B. B.; WOLFE, R. R. Regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. **Annu Rev Nutr**, v. 19, p. 463-484, 1999. ISSN 0199-9885. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10448533>>.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **J Nutr**, v. 127, n. 5 Suppl, p. 838S-841S, May 1997. ISSN 0022-3166. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9164249>>.

REZNICK, R. M.; SHULMAN, G. I. The role of AMP-activated protein kinase in mitochondrial biogenesis. **J Physiol**, v. 574, n. Pt 1, p. 33-39, Jul 2006. ISSN 0022-3751. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16709637>>.

ROPELLE, E. R. et al. 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**, v. 577, n. Pt 3, p. 997-1007, Dec 2006. ISSN 0022-3751. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008371>>.

ROTLLAN, N.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C. MicroRNA Regulation of Cholesterol Metabolism. **Cholesterol**, v. 2012, p. 847-849, 2012. ISSN 2090-1291. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919472>>.

ROTTIERS, V.; NÄÄR, A. M. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 4, p. 239-250, Apr 2012. ISSN 1471-0080. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22436747>>.

RUSSELL, A. P. et al. Skeletal muscle mitochondria: a major player in exercise, health and disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1840, n. 4, p. 1276-1284, Apr 2014. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24291686>>.

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. **J Biol Chem**, v. 274, n. 34, p. 24202-24210, Aug 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10446195>>.

SCHOONJANS, K. et al. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. **J Biol Chem**, v. 270, n. 33, p. 19269-19376, Aug 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7642600>>.

SCHRAUWEN, P.; HESSELINK, M. K. Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 6, p. 1412-1417, Jun 2004. ISSN 0012-1797. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15161742>>.

SHEPHERD, P. R.; KAHN, B. B. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 341, n. 4, p. 248-257, Jul 1999. ISSN 0028-4793. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10413738>>.

SHORTREED, K. E. et al. Muscle-specific adaptations, impaired oxidative capacity and maintenance of contractile function characterize diet-induced obese mouse skeletal muscle. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7293, 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19806198>>.

SIMONEAU, J. A.; KELLEY, D. E. Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. **J Appl Physiol** (1985), v.

83, n. 1, p. 166-171, Jul 1997. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9216960> >.

SPARKS, L. M. et al. A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. **Diabetes**, v. 54, n. 7, p. 1926-1933, Jul 2005. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15983191> >.

STAELS, B. et al. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. **Circulation**, v. 98, n. 19, p. 2088-2093, Nov 1998. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9808609> >.

SUN, T. et al. Role of Exosomal Noncoding RNAs in Lung Carcinogenesis. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 125807, 2015. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26583084> >.

TAY, Y. et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1124-1128, Oct 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806776> >.

TURNER, N. et al. Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 2085-2092, Aug 2007. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17519422> >.

VAN ROOIJ, E. et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. **Dev Cell**, v. 17, n. 5, p. 662-673, Nov 2009. ISSN 1878-1551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19922871> >.

VENTURA-CLAPIER, R.; GARNIER, A.; VEKSLER, V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. **Cardiovasc Res**, v. 79, n. 2, p. 208-217, Jul 2008. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18430751> >.

VU-DAC, N. et al. Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. **J Clin Invest**, v. 96, n. 2, p. 741-750, Aug 1995. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7635967> >.

WANG, Y. X. et al. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. **PLoS Biol**, v. 2, n. 10, p. e294, Oct 2004. ISSN 1545-7885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15328533> >.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight Fact Sheet, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em 14 jan. 2014.

WU, P. et al. Mechanism responsible for inactivation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase complex in starvation and diabetes. **Diabetes**, v. 48, n. 8, p. 1593-1599, Aug 1999. ISSN 0012-1797. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10426378>>.

WU, Z. et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. **Cell**, v. 98, n. 1, p. 115-124, Jul 1999. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10412986>>.

YOUNG, M. E. et al. Reactivation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is associated with contractile dysfunction in hypertrophied rat heart. **J Biol Chem**, v. 276, n. 48, p. 44390-44395, Nov 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11574533>>.

YU, J. et al. Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 349, n. 1, p. 59-68, Oct 2006. ISSN 0006-291X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16934749>>.

YUZEFOVYCH, L.; WILSON, G.; RACHEK, L. Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 299, n. 6, p. E1096-1105, Dec 2010. ISSN 1522-1555. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876761>>.

ZHANDE, R. et al. Molecular mechanism of insulin-induced degradation of insulin receptor substrate 1. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 4, p. 1016-1026, Feb 2002. ISSN 0270-7306. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11809794>>.

ZHANG, B. B.; ZHOU, G.; LI, C. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. **Cell Metab**, v. 9, n. 5, p. 407-416, May 2009. ISSN 1932-7420. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19416711>>.

ZHANG, L. et al. Role of fatty acid uptake and fatty acid beta-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. **Biochim Biophys Acta**, v. 1801, n. 1, p. 1-22, Jan 2010. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19782765>>.

ZHANG, X. et al. MicroRNA directly enhances mitochondrial translation during muscle differentiation. **Cell**, v. 158, n. 3, p. 607-619, Jul 2014. ISSN 1097-4172. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25083871>>.

ZHANG, Y. et al. Estrogen-related receptors stimulate pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4 gene expression. **J Biol Chem**, v. 281, n. 52, p. 39897-39906, Dec 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17079227>>.

ZIERATH, J. R.; HAWLEY, J. A. Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. **PLoS Biol**, v. 2, n. 10, p. e348, Oct 2004. ISSN 1545-7885. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15486583>>.