## JOÃO VICTOR DEL CONTI ESTEVES

# microRNAs 29b, 29c, 199a e 532-3p SÃO POTENCIAIS REPRESSORES DA EXPRESSÃO DE GLUT4 E HK2 EM MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS DIABÉTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Doutor em Ciências.

São Paulo 2016

## JOÃO VICTOR DEL CONTI ESTEVES

# microRNAs 29b, 29c, 199a e 532-3p SÃO POTENCIAIS REPRESSORES DA EXPRESSÃO DE GLUT4 E HK2 EM MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS DIABÉTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado

Versão original

São Paulo 2016 CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Del Conti Esteves, João Victor microRNAs 29b, 29c, 199a e 532-3p são potenciais repressores da expressão de GLUT4 e HK2 em músculo esquelético de ratos diabéticos / João Victor Del Conti Esteves; orientador Ubiratan Fabres Machado. -- São Paulo, 2016. 111 p. Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. Diabetes Mellitus. 2. microRNAs. 3. Músculo esquelético. 4. GLUT4. 5. HK2. I. Fabres Machado, Ubiratan , orientador. II. Título.

#### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): João Victor Del Conti Esteves

Título da Tese: microRNAs 29b, 29c, 199a e 532-3p são potenciais repressores da expressão de GLUT4 e HK2 em músculo esquelético de ratos diabéticos

Orientador(a): Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão 

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universităria "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 157 nas fls. 137 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) Ubiratan Fabres Machado, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "A contração muscular modula a expressão de miRNAs em músculo esquelético de ratos diabéticos?" do qual participam o(s) aluno(s), Danilo Antonio Correa Pinto Júnior, João Victor Del Conti Esteves, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em 28.11.2012, com validade de 4 anos.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador-CEUA - ICB/USP

São Paulo, 29 de novembro de 2012.

Profa. Dra. ANA.PAULA LEPIQUE Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho à memória de Sueli Aparecida Del Conti Esteves, minha amada mãe, minha maior incentivadora.

E à João Regis Pena Esteves, meu amado pai, meu guerreiro e maior exemplo.

#### AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus, por me manter forte nessa caminhada árdua, por estar sempre ao meu lado e ser o meu refúgio nas horas de dificuldade e por me mostrar e me manter no caminho correto.

À toda minha família, irmãos, sobrinhas, cunhados, sogro, sogra, em especial à meu pai, pelo exemplo de garra, caráter, idoneidade e superação, além do apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Aos professores e amigos Solange Marta Franzói de Moraes e Sidney Barnabé Peres, por iniciarem comigo esta caminhada.

À meu orientador, professor Ubiratan Fabres Machado, por me receber de braços abertos em seu laboratório sem ao mesmo me conhecer, pelos muitos ensinamentos, pela amizade, pelo exemplo de dedicação e competência ao trabalho, pelas muitas conversas e conselhos, por acreditar no meu potencial e não medir esforços para me ajudar e criar oportunidades de aprendizado que contribuíram para minha formação profissional e pessoal. Muito obrigado Bira!

Ao professor Francisco Javier Enguita, por me receber em seu laboratório no Instituto de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina de Lisboa, por todos os ensinamentos e suporte no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores membros do exame de qualificação Edilamar Menezes de Oliveira, Alice Cristina Rodrigues e Silvana Auxiliadora Bordin da Silva, por todas as sugestões no encaminhamento deste trabalho.

Aos professores membros da banca por aceitarem o convite e se disporem a avaliar esta tese.

À meu grande amigo Leonardo Vidal Andreato, por estar sempre comigo partilhando dos bons e maus momentos, por toda a colaboração nos trabalhos, por me ajudar no momento de transição para São Paulo, e, junto com o Guilherme Dias e Matheus Sheid, me receberem na "república dos três porquinhos" (rs). O período na república foi muito importante para aprimorar a paciência, tolerância, respeito, e para vivenciar no pele como não se deve manter uma casa (rs), no fundo tudo contribuiu para o meu amadurecimento. Às especialistas do laboratório, Maristela Mitiko Okamoto e Helayne Soares de Freitas, pelos ensinamentos, amizade, risadas, auxílios, paciência, pelos bolos, doces, balas...(rs)

Aos amigos de laboratório Danilo Corrêa Pinto-Júnior, Caio Yogi Yonamine e Frederico Gerlinger Romero, pelos experimentos, discussões, risadas, amizade...

Aos amigos Erika Pinheiro Machado, Maria Luiza Estimo Michalani e José Augusto Cipriano Guedes, que apesar da bagunça e tornarem o estudo no laboratório uma missão quase impossível, fizeram os meus dias de pós-graduação mais felizes.

Aos demais companheiros de laboratório: Aline, João Bahia, Dani Furuya, Patrícia, Luciana Alves, Bruna, Luciana Tocci, Ana Barbara, Raquel, Rosana, e as mais novas, Michele e Larissa, pelo ótimo convívio e discussões frutíferas.

Aos amigos e colegas do ICB, que fizeram o ambiente de trabalho muito mais alegre e saudável: Bruno Alcantara, Gustavo Masson, Renato Nachbar, Felipe Almeida, André Proença, Alcione, Arnaldo Souza, Raul Pinheiro, Sebastião Júnior, Gabriela Moreira, Vitor Felitti, Rafael Salgueiro, Marianinha, Fernanda Sais, Maynara, Chiquinho, Cleytão, Carlão...

Ao amigo José Sinésio da Silva Junior, por toda a parceria durante a pós-graduação.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica por todo o aprendizado, especialmente aos professores Maria Tereza Nunes, William Tadeu Lara Festuccia, Fábio Bessa Lima, Carla Roberta de Oliveira Carvalho e José Cipolla Neto, por abrirem as portas de seus laboratórios, seja para a utilização de algum equipamento, seja para uma conversa ou tirar alguma dúvida, seja apenas para um cafezinho.

À todos os funcionários do departamento e do instituto, sobretudo do biotério (Vilson, Cléo, Renata, Nair e Bob), da secretaria do departamento (Tarcísio, Patrícia e Claudia), do apoio didático (Robertão, Moisés, Marcio, Andreas), da Biblioteca (Paulo (Xuxa), Edilson (Bola), Delza, Valéria, Socorro), assistência acadêmica (Fábio Amancio), manutenção (Sr. Gilberto e Roberto), da portaria (Valdeir), segurança (Léo), limpeza (sr. Peninha e Aline), enfim, todos aqueles que contribuem para o funcionamento e tornam o dia a dia no ICB mais agradável.

Não poderia deixar de agradecer aos especialistas e técnicos, Gilson Murata, Tati, Teca, Julieta, Adilson e Leonice, pela disposição, risadas e ajuda de sempre. Um agradecimento especial aos secretários do programa de pós-graduação, José Maria Rodrigues Junior e Paloma T. Nunes Cañipa, por fazerem o programa "andar" e segurarem todas as "buchas" e muitas vezes não serem lembrados; por trabalharem com tanta dedicação, por todas as dúvidas e esclarecimentos prestados, pela amizade de todos estes anos. O meu reconhecimento e agradecimento.

Aos professores do ICB ainda não lembrandos e que contribuíram com minha formação através de disciplinas e PAE: Edna Teruko Kimura, Rui Curi, Gabriela Placoná Diniz, Joaquim Procópio, Luiz Roberto Giorgetti de Britto e Angelo Rafael Carpinelli.

Aos professores membros da Comissão Coordenadora do Programa, Vagner Roberto Antunes, Maria Oliveira de Souza, Andréa da Silva Torrão, Luciana Venturini Rossoni, Lisete Compagno Michelini, Nancy Amaral Reboucas, Raif Musa Aziz e José Donato Júnior, pelas discussões e todo o aprendizado que tive nos últimos anos como representante discente nesta comissão.

Aos companheiros da Associação dos Pós-Graduandos do ICB (APG/ICB) e da USP (APG/USP), por meio do coletivo "Unindo Forças na USP", especialmente ao amigo Phillipe Pessoa, por todas as conversas e discussões, assembleias, reuniões, projetos e aprendizados nestes anos.

Aos pós-graduandos do ICB e USP por confiarem na minha capacidade de representálos junto ao Conselho de Departamento de Fisiologia e Biofísica, Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana, Congregação do ICB, Conselho de Pesquisa da USP e APG/ICB e APG/USP.

Aos ratos que literalmente se sacrificaram por esse estudo, mas desejo muito que não tenha sido em vão.

À CAPES e principalmente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento e bolsa de estudo (processo 2012/20432-0).

Por último e não menos importante, agradeço imensamente à minha esposa Hemerli de Cinque Almeida Esteves. Pelo incentivo e apoio incondicionais, pela paciência e compreensão, amor, amizade e companheirismo de sempre. Sem você, nada disso teria sido possível. Te amo!

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota"

Santa Teresa de Calcutá

#### RESUMO

ESTEVES, J. V. D. C. microRNAs 29b, 29c, 199a e 532-3p são potenciais repressores da expressão de GLUT4 e HK2 em músculo esquelético de ratos diabéticos. 2016. 111 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Diabetes é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia associada a prejuízos na captação e utilização de glicose, em que reduções na expressão da proteína GLUT4 (codificada pelo gene SLC2A4), bem como das enzimas Hexokinase-2 e Glycogen synthase (codificadas pelos genes HK2 e GYS1), desempenham papel importante. Recentemente, um novo elemento vem sendo relacionado à etiopatogenia e à fisiopatologia do diabetes, os microRNAs (miRNAs), que são pequenos RNAs envolvidos na regulação da expressão gênica, geralmente afetando a degradação de mRNAs. Entretanto, a participação de miRNAs envolvidos na redução da expressão de mRNAs relacionados a proteínas envolvidas na captação e utilização de glicose, sobretudo em músculo esquelético, permanece desconhecida. O objetivo desse estudo foi investigar a expressão de miRNAs potencialmente reguladores da expressão de Slc2a4/GLUT4, Hk2/HK2 e Gys1/GYS1 em músculo esquelético de ratos diabéticos. Utilizamos ratos Wistar machos que foram tornados diabéticos pela administração de estreptozotocina. Após 13 dias, 3 grupos foram formados: não-diabético (ND) e diabético tratado com placebo (DP) ou insulina (DI). O tratamento foi conduzido por 7 dias, totalizando 21 dias de diabetes. Variáveis metabólicas foram avaliadas e os músculos sóleos foram removidos para avaliar a expressão de mRNAs, miRNAs e proteínas. Uma abrangente análise in silico foi conduzida para determinar miRNAs candidatos a regularem a expressão de Slc2a4, Hk2 e Gys1. Os animais diabéticos apresentaram perda de peso, poliúria, glicosúria, hiperglicemia e aumento de frutosamina plasmática; a insulinoterapia melhorou estas variáveis. O diabetes reduziu a expressão dos mRNAs Slc2a4 (~55%), Hk2 (~47%) e Gys1 (~45%), e das proteínas GLUT4 (~77%), HK2(~52%) e GYS1 (~49%); a insulinoterapia restaurou essas variáveis. A expressão de 20 miRNAs foi avaliada neste estudo; 8 foram modulados pelo diabetes, sendo três supra-regulados, miR-1 (~28%), miR-29b (~118%) e miR-29c (~51%); e cinco infra-regulados, miR-93 (~39%), miR-199a (~30%), miR-345-3p (~23%), miR-532-3p (~26%) e miR-150 (~32%). Exceto pelo miR-1 e miR-150, a insulinoterapia reverteu as demais alterações. Além disso, miR-29b e miR-29c correlacionaram-se negativamente com GLUT4 e HK2, e positivamente com glicemia, glicosúria e frutosamina, sugerindo uma possível relação causal; enquanto que miR-199a e miR-532-3p correlacionaram-se positivamente com GLUT4 e HK2, e também com as variáveis metabólicas, sugerindo uma regulação indireta sobre os mRNAs dessas proteínas. No último caso, demonstrou-se que o miR-199a tem como alvo o NFKB1, um repressor do gene Slc2a4, o qual diminuiu no diabetes, explicando, pelo menos parcialmente, o efeito indireto sobre o GLUT4. Em suma, o diabetes aumenta a expressão de miR-29b e miR-29c, e reduz a expressão de miR-199a e miR-532-3p; o primeiro efeito, potencialmente age diretamente na tradução do mRNA Slc2a4 e Hk2, e o segundo, potencialmente age indiretamente, via NFKB, na transcrição dos genes. Como consequência, as proteínas GLUT4 e HK2 diminuem, o que reduziria a utilização de glicose pelo músculo, contribuindo para a hiperglicemia do diabetes.

**Palavras-chave:** Sóleo. Diabetes. MicroRNAs. Regulação pós-transcricional. *Slc2a4*. GLUT4. *Hk2*. *Gys1*.

#### ABSTRACT

ESTEVES, J. V. D. C. microRNAs 29b, 29c, 199a e 532-3p are potentials repressors of GLUT4 and HK2 expression in skeletal muscle of diabetic rats. 2016. 111 p. Thesis (Ph. D. Thesis in Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Diabetes is a metabolic disease characterized by hyperglycemia associated with impaired glucose metabolism and uptake, in which reductions of GLUT4, hexokinase 2 (HK2) and glycogen synthase 1 (GYS1) proteins, encoded respectively by SLC2A4, HK2 and GYS1 genes, play an important role. Recently, a new element have been related to etiopathogeny and pathophysiology of diabetes, the microRNAs (miRNAs), which are small RNAs involved in the regulation of gene expression, usually by affecting the degradation of mRNAs. However, the participation of miRNAs diabetes-induced reduction of expression of genes related to glucose uptake and metabolism in skeletal muscle remains unknown. Thus, the objective of this study was to investigate the expression of miRNAs potentially regulators of the Slc2a4/GLUT4, Hk2/HK2 and Gys1/GYS1 in skeletal muscle of diabetic rats. Male Wistar rats were rendered diabetic by receiving streptozotocin. After 13 days, 3 groups were formed: non-diabetic (ND), and diabetic treated with placebo (DP) or insulin (DI) (NPH insulin, 6U/day). Treatment was conducted for 7 days, totalizing 21 days of diabetes. At the end of the experimental period, metabolic variables were evaluated and the soleus muscle was removed for evaluation of mRNA, miRNA and protein expression. A broad in silico analysis was performed to determine candidate miRNAs as potential regulators of Slc2a4, Hk2 and Gys1. Diabetic rats shown weight loss, polyuria, glycosuria, hyperglycemia and increased plasma fructosamine; insulin treatment improved these variables. Diabetes reduced Slc2a4 (~55%), Hk2 (~47%) and Gys1 (~45%) mRNAs, as well as GLUT4 (77%), HK2 (52%) and GYS1 (49%) proteins; insulin treatment restored these variables. Twenty miRNAs were assessed in this study. Eight miRNAs were modulated by diabetes in skeletal muscle; three were upregulated: miR-1 (28%), miR-29b (118%) and miR-29c (51%), whereas five were downregulated: miR-93 (39%), miR-150 (32%), miR-199a (30%), miR-345-3p (23%) and miR-532-3p (26%). Except for miR-1 and miR-150, all regulations were reverted by insulin treatment. Besides, miR-29b and miR-29c were negatively correlated with GLUT4 and HK2 proteins, and positively with glucose, glycosuria and plasma fructosamine suggesting a direct causal relationship; while miR-199a and miR-532-3p were positively correlated with GLUT4 and HK2 proteins, and also with the metabolic variables, suggesting an indirect causal relationship. In the last case, it was demonstrated that miR-199a has the Slc2a4 repressor *Nfkb1* as target, which was reduced in muscle from diabetic rats, explaining, at least partially, the indirect effect upon GLUT4. In conclusion, diabetes increase the expression of miR-29b and miR-29c, and reduce the expression of miR-199a e miR-532-3p; the first effect, potentially acts directly in the translation of Slc2a4 and Hk2 mRNAs, and the second one, potentially acts indirectly, via NFKB, in the transcription of these genes. As a result, the expression of GLUT4 and HK2 decreases, which would reduce the muscle glucose uptake and metabolization, contributing to the hyperglycemia of the diabetes.

**Keywords:** Soleus. Diabetes. MicroRNAs. Post-transcriptional regulation. *Slc2a4*. GLUT4. *Hk2*. *Gys1*.

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Actb	β-actina
ADA	American Diabetes Association
AGO	Argonauta
AKT	RAC-alpha serine-threonine-protein kinase
AMPK	proteína cinase ativada por AMP
ANOVA	análise de variância
AS160	TBC1 domain family member 4
ATP	adenosina trifosfato
B2m	β-2 microglobulina
CaMK	proteína cinase dependente de Ca2+/calmodulina
cDNA	DNA complementar
Ct	cicle threshold
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
DI	diabético tratado com insulina
DM	diabetes mellitus
DM1	diabetes mellitus do tipo 1
DM2	diabetes mellitus do tipo 2
DNA	deoxyribonucleic acid
DP	diabético tratado com placebo
EDL	extensor digitalis longus
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EPM	erro-padrão da media
ESR1	estrogen receptor 1
Gapdh	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GEF	GLUT4 enhancer fator
GK	Goto-Kakizaki
GLUT4	solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4
GSK3	glycogen synthase kinase-3
GW182	glycine-tryptophan [GW] repeat-containing protein of 182 kDA
Gys1	glycogen synthase 1
G6pc	glucose-6-phosphatase catalytic subunit
HbA1c	hemoglobina glicada
HCl	Ácido clorídrico
HIF-1a	hypoxia inducible factor 1a
Hk2	hexokinase 2
HOMA	homeostatic model assessment
Hprt1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
IDF	International Diabetes Federation
Igf1r	insulin-like growth factor 1 receptor
Insr	insulin receptor

Irs1	insulin receptor substrate 1
Irs2	insulin receptor substrate 2
KLF15	kruppel like factor 15
MAPK	mitogen activated protein kinase
MEF2A	myocyte enhancer factor 2 A
MEF2D	myocyte enhancer factor 2 D
miRISC	miRNA-inducing silencing complex
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
MTOR	serine/threonine-protein kinase mTOR
MYOD1	myoblast determination protein 1 MYOD1
ND	não diabético
NFIB	nuclear factor 1B
NFKB	nuclear factor kappa B
Nfkb1	nuclear factor kappa B subunit 1
O/E-1	transcription factor COE1
p53	cellular tumor antigen p53
P70S6K1	ribosomal protein S6 kinase beta-1
PCR	reação em cadeia da polimerase
Pck1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
РКВ	protein kinase B
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PPARalfa	peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPARgama	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Ppargcla	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha
pre-miRNA	miRNA precursor
pri-miRNA	miRNA primário
qPCR	quantitative real-time PCR
Rela	RELA proto-oncogene, NF-kB subunit
RNA	ribonucleic acid
RT	reverse transcription
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SDS-PAGE	Sodium Duodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SLC2A4	solute carrier family 2 member 4
SREBP-1	sterol regulatory element-binding protein 1
TRα	thyroid hormone receptor alpha
UTR	untranslated region
ZEB1	zinc finger E-box-binding homeobox 1
ZEB2	zinc finger E-box-binding homeobox 2

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	
2 JUSTIFICATIVA	
3 OBJETIVOS	
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1 Animais	37
4.2 Procedimento experimental	37
4.4 Dosagens bioquímicas	38
4.5 Avaliação de proteínas no músculo (Western blotting)	38
4.6 Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR	40
4.7 Expressão de microRNAs	42
4.8 Análise in silico	44
4.9 Análise estatística	45
5 RESULTADOS	
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÃO	
REFERÊNCIAS	
APÊNDICES	
APÊNDICE A - CORRELAÇÕES	

### 1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica de alta prevalência no mundo (ZHANG et al., 2010). É caracterizado por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. Em 2013, estimou-se que 382 milhões de pessoas (cerca de 8,3% da população adulta com idades entre 20 e 79 anos) eram portadores de diabetes, com projeção de 592 milhões de adultos com a doença até 2035 (GUARIGUATA et al., 2014). Segundo os mesmos autores, entre 2013 e 2035, haverá um aumento global de 55% no número de adultos com diabetes, com este percentual variando substancialmente de acordo com o nível de renda do país, estimando-se um aumento de 61% no Brasil. Nos países industrializados, o DM já é a principal causa de cegueira, insuficiência renal e amputações de membros inferiores, além de ser um fator de risco importante para doenças cardiovasculares e acidente vascular cerebral (ADA, 2013).

Além da alta prevalência e dos problemas de saúde associados à doença, os onerosos gastos direta e indiretamente causados nos sistemas de saúde geram muita preocupação. Segundo posicionamento da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), os custos diretos com DM variam entre 2,5% e 15% do orçamento anual da saúde, dependendo de sua prevalência e do grau de sofisticação do tratamento disponível (SBD, 2015). Em 2012, a *American Diabetes Association* (ADA) estimou que US\$176 bilhões foram gastos diretamente para o tratamento de DM nos Estados Unidos (ADA, 2013). Dados recentes, publicados no Atlas do Diabetes divulgado pela *International Diabetes Federation* (IDF), estimaram um gasto de pelo menos US\$ 673 bilhões com a doença em 2015 em todo o mundo, o que deve ultrapassar US\$ 802 bilhões em 2040 (IDF, 2015).

As formas mais prevalentes da doença são o diabetes mellitus do tipo 1 (DM1) e do tipo 2 (DM2), sendo que o último é responsável por mais de 90% dos casos (ADA, 2011). O DM1 é resultado da falta da secreção de insulina consequente à destruição das células beta pancreáticas. Já no DM2, alteração na secreção da insulina se desenvolve em consequência à resistência ao hormônio em tecidos alvo, sobretudo em fígado, tecido adiposo e músculo esquelético (ADA, 2011). No DM2, fatores genéticos e ambientais que propiciam uma diminuição do dispêndio energético e/ou aumento da ingestão energética, favorecem o desenvolvimento da resistência à insulina, em geral acompanhando obesidade, que é base etiopatogênica da doença (LING; GROOP, 2009; MUOIO; NEWGARD, 2008).

Diversos estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar os principais mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia do DM2. Sabe-se que resistência à insulina é a base do desenvolvimento e da manutenção da perda da homeostasia glicêmica (DEFRONZO, 2004), fenômeno no qual a musculatura esquelética desempenha um papel preponderante (SAVAGE et al., 2005). Ainda, no DM1, onde a insulinoterapia é obrigatória, a resistência à insulina no músculo também pode estar presente, contribuindo para os prejuízos captação de glicose, especialmente pela hiperinsulinização na e/ou glicotoxicidade/lipotoxicidade observadas (OKAMOTO et al., 2011; SCHAUER et al., 2011). Além disso, recentes estudos têm mostrado que portadores de DM1 tem alterado o seu fenótipo nas últimas décadas, apresentando elevada taxa de sobrepeso/obesidade e resistência à insulina (BACHA; KLINEPETER BARTZ, 2015; MERGER et al., 2016; MERGER; LESLIE; BOEHM, 2013).

O músculo esquelético representa cerca de 40% da massa corporal total e, em indivíduos saudáveis, é responsável por ~80% da captação de glicose sob estímulo insulínico (DEFRONZO et al., 1981), sendo considerado o maior território de resistência periférica à insulina (ZIERATH; KROOK; WALLBERG-HENRIKSSON, 2000). Em indivíduos com DM, a redução na captação de glicose pelo músculo é uma característica presente (DEFRONZO, 2004; MERGER et al., 2016). Nesse contexto, destaca-se o papel da proteína transportadora de glicose *solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4* (GLUT4).

A proteína GLUT4 (codificada pelo gene solute carrier family 2 member 4 - SLC2A4), é o principal transportador de glicose do tecido adiposo branco e marrom e dos músculos esquelético e cardíaco (ULDRY; THORENS, 2004). Sob condições basais (sem estímulo insulínico), uma grande quantidade de GLUT4 encontra-se no compartimento intracelular, inserido em membranas de estruturas vesiculares (FOLEY; BOGUSLAVSKY; KLIP, 2011; KLIP, 2009; SHEPHERD; KAHN, 1999). Sob estímulo insulínico, as vesículas intracelulares são translocadas para a membrana plasmática, e no caso do músculo, também para os túbulos transversos, aumentando rapidamente a densidade de GLUT4 nestas superfícies celulares, e aumentando desse modo a captação de glicose pelos tecidos alvo (FOLEY; BOGUSLAVSKY; KLIP, 2011; KLIP, 2009; SHEPHERD; KAHN, 1999).

Além disso, no músculo esquelético, é importante destacar que a contração muscular também promove a translocação de GLUT4, por mecanismos que envolvem pelo menos duas proteínas: proteína cinase ativada por AMP (AMPK) e proteína cinase dependente de Ca2+/calmodulina (CaMK) (JESSEN; GOODYEAR, 2005). Essas proteínas podem atuar em paralelo ou em conjunto com outras proteínas estimuladas pela insulina, proporcionando assim efeitos aditivos na captação de glicose (RICHTER; HARGREAVES, 2013). Além do efeito agudo da insulina e contração muscular sobre a translocação de GLUT4, estudos de nosso laboratório demonstraram que ambos os estímulos foram capazes de aumentar a expressão de *Slc2a4*/GLUT4, por respectivamente ativar ou inibir fatores transcricionais estimulatórios (*enhancers*) ou repressores (*repressors*) (LIMA et al., 2009; MORAES et al., 2014; SILVA et al., 2005). Desse modo, a proteína GLUT4 é o principal mediador do *clearance* de glicose extracelular, desempenhando um papel chave na regulação da homeostasia glicêmica (DEFRONZO, 2004, HUANG; CZECH, 2007).

Dentre as principais proteínas que atuam como fatores trancricionais estimulatórios da expressão de *Slc2a4*/GLUT4 em músculo esquelético destacam-se: *myocyte enhancer factor* 2 A/D, (MEF2A, MEF2D), *myoblast determination protein* 1 (MYOD1), *thyroid hormone receptor alpha* (TRα), *hypoxia inducible factor* 1*a* (HIF1a), *kruppel like factor* 15 (KLF15) e GLUT4 *enhancer fator* (GEF) (IM et al., 2007; KARNIELI; ARMONI, 2008; ZORZANO; PALACÍN; GUMÀ, 2005). Por outro lado, os principais fatores transcricionais repressores do *SLC2A4* são: *nuclear factor kappa B* (NFKB), *transcription factor* COE1 (COE1), *nuclear fator* 1*B* (NF1B), peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalfa) e PPARgama (IM et al., 2007; KARNIELI; ARMONI, 2008; ZORZANO; PALACÍN; GUMA, 2005).

Considerando o papel central da captação de glicose no músculo esquelético para a manutenção da homeostasia glicêmica, vários estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos na regulação da expressão de *SLC2A4/GLUT4* no músculo de portadores de diabetes. Entretanto, vale a pena destacar que, como o músculo esquelético apresenta diferentes tipos de fibras musculares, a sensibilidade à insulina, a expressão de *GLUT4* e consequentemente a regulação da expressão do *SLC2A4* podem variar. Por exemplo, fibras do tipo I (vermelhas, de contração lenta, oxidativas) são significativamente mais sensíveis à insulina do que as fibras do tipo IIa/b (brancas, de contração rápida, oxidativas/glicolíticas), e expressam maior quantidade de GLUT4 (DAUGAARD et al., 2000; HENRIKSEN et al., 1990; KERN et al., 1990). Em músculo incubado de ratos, foi observado que a captação de glicose estimulada por insulina é duas vezes maior em fibras do tipo IIa (oxidativas/glicolíticas) em comparação com fibras do tipo IIb (glicolíticas), sugerindo que a captação de glicose mediada pela insulina está relacionada à capacidade oxidativa da fibra muscular (MACKRELL; CARTEE, 2012). Adicionalmente, em

18

músculo de humanos, uma correlação positiva foi demonstrada entre a proporção de fibras do tipo I e a sensibilidade à insulina (STUART et al., 2013). Assim, a participação do músculo esquelético na homeostasia glicêmica deve levar em consideração a proporção corporal entre os tipos de fibras musculares.

Em relação à expressão de SLC2A4/GLUT4 no músculo em situações de obesidade e diabetes, diferentes resultados foram reportados. Em modelos experimentais de diabetes, a regulação de GLUT4 parece variar de acordo com o tipo de fibra muscular: em músculos sóleo (predominantemente fibras do tipo I) e extensor longo dos dedos (extensor digitalis longus – EDL) e gastrocnêmios (fibras mistas, tipo IIa > IIb), o conteúdo de GLUT4 é diminuído (ALVES-WAGNER et al., 2014; HARDIN; DOMINGUEZ; GARVEY, 1993; MACHADO; SHIMIZU; SAITO, 1993; OKAMOTO et al., 2011); enquanto nos músculos vasto lateral e reto abdominal (fibras do tipo IIb > IIa) o conteúdo de GLUT4 é inalterado (HARDIN; DOMINGUEZ; GARVEY, 1993). Em humanos obesos e/ou DM2, a expressão de *SLC2A4*/GLUT4 é descrita como inalterada em músculo vasto lateral (GARVEY et al., 1992; HANDBERG et al., 1990; PEDERSEN et al., 1990) ou diminuída em músculos reto abdominal e vasto lateral (DOHM et al., 1991, GASTER et al., 2001). Ademais, no músculo vasto lateral de indivíduos DM2, uma redução tanto na quantidade de fibras do tipo I, quanto na expressão de GLUT4 foram observadas, o que levou os autores a proporem que a resistência à insulina no DM2 é uma doença de fibras do tipo I (GASTER et al., 2001). Desse modo, apesar de alguns resultados controversos, atualmente é bem aceito que a redução na expressão de GLUT4 participa diretamente no prejuízo da captação de glicose pelo músculo nas condições de resistência à insulina e diabetes, tanto em modelos animais como em humanos (CAMPS et al., 1992; GASTER et al., 2001; KAINULAINEN et al., 1994; MACHADO; SHIMIZU; SAITO, 1993).

O papel fundamental da expressão de GLUT4 no músculo esquelético para a homeostasia glicêmica foi reforçado com o desenvolvimento de modelos animais geneticamente modificados (HERMAN; KAHN, 2006). Animais transgênicos com redução na expressão de GLUT4 no tecido muscular apresentam um fenótipo diabético, com hiperglicemia, intolerância à glicose e resistência à insulina (KIM et al., 2001; ZISMAN et al., 2000). Por outro lado, animais transgênicos com expressão aumentada de *SLC2A4*/GLUT4 em músculo, apresentam menores níveis basais de glicemia, maior tolerância à glicose, aumento na captação de glicose e síntese de glicogênio muscular, e mesmo quando estes foram tornados diabéticos (por administração de estreptozotocina), permanecem mais sensíveis à insulina (LETURQUE et al., 1996; TSAO et al., 1996). Estes e outros trabalhos

evidenciam o papel fundamental do GLUT4 na manutenção da homeostasia glicêmica. Desse modo, o aumento da expressão de *SLC2A4*/GLUT4 é uma estratégia importante e desejável para o tratamento farmacológico de indivíduos com resistência à insulina/diabetes (CORRÊA-GIANNELLA; MACHADO, 2013).

Assim, a expressão adequada de GLUT4 representa etapa limitante no processo de captação de glicose pelo músculo, e a captação de glicose fica comprometida tanto por redução na capacidade de translocação do GLUT4 (HERMAN; KAHN, 2006) como, principalmente, por redução na expressão do transportador (CORRÊA-GIANNELLA; MACHADO, 2013; KARNIELI; ARMONI, 2008). O conhecimento profundo dos mecanismos envolvidos na regulação da expressão do *SLC2A4*/GLUT4 é a base para o desenvolvimento de medidas preventivas e/ou terapêuticas.

Além de prejuízos no transporte de glicose, portadores de diabetes frequentemente apresentam anormalidades na metabolização desse substrato, o que envolve diretamente os processos de fosforilação de glicose e síntese de glicogênio (KELLEY; MOKAN; MANDARINO, 1992; SHULMAN et al., 1990). A glicose que entra na célula muscular é inicialmente fosforilada pela proteína hexocinase II (codificada pelo gene *hexokinase 2, Hk2*) passando a glicose-6-fosfato e, esta é estocada como glicogênio ou oxidada na mitocôndria por meio de processos regulados pela proteína glicogênio sintase (codificada pelo gene *glycogen synthase 1, Gys1*) e o complexo piruvato desidrogenase, respectivamente (ALBERS et al., 2015).

O músculo esquelético expressa duas isoformas de hexocinase, sendo a mais expressa a isoforma II (HK2) (KATZEN; SCHIMKE, 1965). Em resposta à insulina, os níveis de *Hk2*/HK2 em roedores e humanos não-diabéticos aumentam (MANDARINO et al., 1995; POSTIC et al., 1993; VOGT et al., 2000). Além disso, o exercício físico agudo também é capaz de aumentar a atividade e a expressão de *Hk2* ((HILDEBRANDT; PILEGAARD; NEUFER, 2003; O'DOHERTY et al., 1994, 1996). Ainda, similarmente ao observado com o GLUT4, a composição das fibras musculares também afeta o conteúdo de HK2, que é maior em fibras do tipo I comparado com fibras do tipo II (ALBERS et al., 2015; JENSEN et al., 2012).

Os primeiros trabalhos que caracterizaram a estrutura do gene *Hk2* em roedores e humano foram realizados em meados dos anos 90 (DEEB; MALKKI; LAAKSO, 1993; PRINTZ et al., 1993), desde então diversos mecanismos foram descritos como estimuladores

da transcrição de *Hk2*: insulina, catecolaminas, AMP cíclico, desnervação, AMPK, exercício físico, dentre outros (HILDEBRANDT; PILEGAARD; NEUFER, 2003; JONES et al., 1997; JONES; DOHM, 1997; OSAWA et al., 1995; STOPPANI et al., 2002). Entretanto, poucos foram os estudos que descreveram os fatores transcricionais capazes de mediar os efeitos descritos. Nesse sentido, destaca-se o estudo conduzido por Gosmain et al. (2004), que demonstrou que proteína *sterol regulatory element-binding protein 1* (SREBP-1) medeia o aumento da expressão de *Hk2* promovido pela insulina em músculo, por se ligar nos elementos regulatórios de esterol (do inglês sterol regulatory elements) na região promotora deste gene, promovendo a sua transcrição.

Em portadores de DM2, a capacidade da insulina em aumentar a atividade e a expressão de *Hk2* é marcadamente reduzida em relação aos indivíduos controles (VOGT et al., 2000). Além disso, em condições basais, foram observadas reduções na atividade, no mRNA e nos níveis proteicos de HK2 em músculo esquelético de humanos com DM2 e obesidade (PENDERGRASS et al., 1998; VESTERGAARD et al., 1995), ou com intolerância à glicose (LEHTO et al., 1995). Todos estes dados reforçam a associação presente entre a resistência à insulina observada no diabetes e os prejuízos na fosforilação da glicose.

Além da fosforilação da glicose, outro processo determinante no metabolismo deste substrato no músculo, contribuindo para a homeostasia glicêmica, é a síntese de glicogênio, cuja enzima glicogênio sintase (GYS1) possui papel chave (DEFRONZO, 2004). Apesar do músculo e do fígado serem capazes de sintetizar glicogênio, ambos os tecidos expressam isoformas diferentes desta proteína. De maneira geral, a glicose que foi fosforilada pela HK2 formando glicose-6-fosfato pode entrar na via glicolítica para produção de ATP ou ser convertida pela enzima fosfoglicomutase a glicose-1-fosfato, podendo assim ser polimerizada na forma glicogênio por meio da GYS1 (GREENBERG et al., 2006).

A regulação da síntese de glicogênio é complexa e envolve diversas proteínas cinases, com destaque para a glycogen synthase kinase-3 (GSK3) (MACAULAY et al., 2005). Em condições basais, a proteína GSK3 esta constitutivamente ativa (desfosforidala) e inibe a síntese de glicogênio pela fosforilação e consequentemente inibição da GYS1 (LEE; KIM, 2007). Sob estímulo insulínico e/ou contração muscular, a GSK3 é fosforilada e sua atividade é inibida por um mecanismo dependente de *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K)/*protein kinase B* (PKB), assim desfosforilando e ativando a GYS1, liberando a síntese de glicogênio (ELDAR-FINKELMAN, 2002; LAI et al., 2007).

Assim, sob baixas concentrações de insulina, a síntese de glicogênio e a oxidação de glicose (pela via glicolítica) contribuem igualmente para o *clearance* de glicose; entretanto, em condições de aumento das concentrações de insulina, a síntese de glicogênio é predominante (DEFRONZO, 2004; SHULMAN et al., 1990). Tem sido descrito que o prejuízo na síntese de glicogênio sob estimulo insulínico é uma característica comum em vários estados de resistência à insulina, incluindo obesidade, intolerância à glicose e diabetes, contribuindo fortemente para a perda da homeostasia glicêmica (GROOP et al., 1989; KELLEY; MOKAN; MANDARINO, 1992; SHULMAN et al., 1990; VIND et al., 2012). Ademais, portadores de DM2 apresentam diminuição no mRNA e nos níveis proteicos de GYS1 no músculo esquelético (VESTERGAARD et al., 1993). Desse modo, em consonância com os prejuízos descritos no transporte e fosforilação de glicose no músculo esquelético, a síntese de glicogênio é outra via metabólica que é afetada nas situações de resistência à insulina, contribuindo sobremaneira para a perda da homeostasia glicêmica observada nessas condições.

Recentemente, surgiu um novo elemento na fisiopatologia do DM, o qual tem recebido elevado destaque. Trata-se de um grupo de pequenos RNAs, não codificadores de proteínas, denominados microRNAs. Os microRNAs (miRNAs) são moléculas regulatórias (de ~22 nucleotídeos) que atuam em paralelo ou em conjunto com fatores transcricionais, tendo uma importante contribuição em alterações de expressão de genes (BARTEL, 2004).

Desde a descrição do primeiro miRNA em 1993 (na época chamado de small RNA) denominado lin-4, capaz de interagir com a região 3'-UTR (do inglês, *untranslated region* (UTR) do *lin-14*, regulando negativamente a expressão da proteína LIN-14 e comprometendo o desenvolvimento larval de *C. Elegans* (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; WIGHTMAN; HA; RUVKUN, 1993), e desde a identificação do primeiro miRNA-let-7 em 2000 no homem (PASQUINELLI et al., 2000), milhares de miRNAs já foram descritos em centenas de espécies, revolucionando o entendimento da regulação da expressão gênica. A tabela 1 apresenta o número de sequências de miRNAs de algumas espécies depositadas no banco de dados de miRNAs, denominado miRBase.

Espécie	Precursor (pre-miRNA)	Maduro (miRNA)
Homo sapiens	1881	2588
Rattus norvegicus	495	765
Mus musculus	1193	1915
Caenorhabditis elegans	250	434

Tabela 1 - Número de sequências de miRNAs depositadas na versão 21 do miRBase.

Fonte: miRBase (2014).

Também conforme o miRBase (2014), existem 28.645 precursores *hairpins* de miRNAs (sequências de pre-miRNA) depositadas no banco de dados e 35.828 produtos maduros de miRNAs que englobam 223 espécies. A evolução do descobrimento de novos miRNAs pode ser observada na figura 1.



Figura 1 - Evolução no número de entradas (precursores *hairpins* de miRNAs) disponibilizadas temporalmente no miRBase. No eixo X, observam-se todas as versões (de v1 até v21) e respectivas entradas disponibilizadas ao longo do tempo no miRBase. Fonte: miRBase (2014).

De acordo com a sua localização genômica, os miRNAs podem ser classificados em três classes distintas: miRNAs intergênicos; miRNAs intrônicos e miRNAs exônicos, sendo estes dois últimos conhecidos como miRNAs intragênicos (HUSSAIN, 2012; OLENA; PATTON, 2010). A figura 2, apresenta a ilustração da localização genômica dos miRNAs. Os

miRNAs intergênicos localizam-se entre duas unidades transcricionais, sua expressão é regulada por seus próprios promotores, podem ser mono ou policistrônicos e possuem características semelhantes às unidades transcricionais de genes codificadores de proteínas, como sítios de início de transcrição, regiões regulatórias e sinalização para cauda poli(A) (HUSSAIN, 2012; OLENA; PATTON, 2010). Os miRNAs intrônicos são encontrados em íntrons de genes que codificam ou não proteínas; podem estar presentes como um simples miRNA ou em forma de cluster de vários miRNAs e geralmente se utilizam dos mesmos promotores de sua unidade transcricional hospedeira. Quando ocorre a transcrição, seguida do processamento pela maquinaria do *splicing*, e o precursor do miRNA (pre-miRNA) apresenta o tamanho exato do íntron, este recebe o nome de miRtron (OKAMURA et al., 2007). Já os miRNAs exônicos são encontrados no final de um éxon, estendendo-se para o início do íntron adjacente de um gene não-codificador e compartilham os promotores de seu gene hospedeiro (OLENA; PATTON, 2010).



Figura 2 - Localização genômica dos miRNAs. A) miRNAs intergênicos e clusterizados; B) miRNAs intrônicos, miRtrons e clusterizados; C) miRNAs exônicos. Os detalhes são encontrados no texto. Fonte: modificada de Olena e Patton (2010).

Quanto ao processo de biogênese dos miRNAs, canonicamente eles são transcritos no núcleo pela RNA polimerase II, resultando na formação do miRNA primário (pri-miRNA),

que possui estrutura característica em forma de grampo de cabelo (do inglês hairpin) e centenas de pares de base. Ainda no núcleo, o pri-miRNA é processado por um complexo microprocessador composto principalmente por uma ribonuclease Drosha (uma enzima RNase III) e a proteína DGCR8 (do inglês DiGeorge syndrome critical region gene 8) formando o miRNA precursor (pre-miRNA), com ~70 pares de bases e com um overhang de 2 a 3 nucleotídeos na região 3'. O pre-miRNA é exportado do núcleo celular para o citoplasma por uma maquinaria de exportação denominada Exportin-5 e uma guanina trifosfatase (Ran-GTPase). No citoplasma, o pre-miRNA é processado por um complexo enzimático chamado Dicer (uma RNA III) que reconhece e cliva o hairpin do precursor para formar um complexo miRNA-miRNA dupla fita (miRNA duplex). Uma das fitas do duplex, chamada de passageira ou estrela é degradada e a outra fita é levada para um complexo proteico chamado de complexo de silenciamento induzido por miRNA (do inglês miRNAinducing silencing complex – miRISC). Proteínas da família argonauta (AGO) e da classe de proteínas glicina-triptofano (do inglês, glycine-tryptophan [GW] repeat-containing protein of 182 kDa - GW182) são os principais componentes do miRISC. A figura 3, ilustra o processo de biogênese dos miRNAs.



Figura 3 - Biogênese dos miRNAs. Mais detalhes estão descritos no texto. Fonte: modificada de Hussain (2012).

É importante destacar que as diferentes etapas de biogênese do miRNA (transcrição, maturação e a incorporação do miRNA ao complexo RISC) podem sofrem regulação em todos os seus níveis, adicionando uma complexidade ainda maior na sua modulação. Por exemplo, a RNA polimerase II que efetua a transcrição dos miRNAs, é controlada por diferentes fatores de transcrição associados, como *cellular tumor antigen* p53 (p53), myc *proto-oncogene protein* (MYC), *zinc finger E-box-binding homeobox 1* (ZEB1), ZEB2 e MYOD1, que regulam positiva ou negativamente a expressão dos miRNA, e, por reguladores epigenéticos, como metilação de DNA e modificações de histonas (DAVIS-DUSENBERY; HATA, 2010; HA; KIM, 2014; KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010). Além disso, os fatores transcricionais que reconhecem e transcrevem genes de miRNAs podem ser diretamente regulados pelos próprios miRNAs maduros, criando diferentes circuitos de retroalimentação (*feedback*) negativa (KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010). A figura 4 ilustra a regulação da transcrição de miRNAs.



Figura 4 - Regulação da transcrição gênica de miRNAs. As regiões promotoras de genes de miRNA são altamente similares aquelas de genes codificadores de proteínas, com a presença de ilhas CpGs, sequencias TATA box, elementos de iniciação e certas modificações de histonas, indicando que são controladas por fatores de transcrição, *enhancers*, elementos de silenciamento e modificações de cromatina. Fatores de transcrição ativadores ou repressores são mostrados em verde e vermelho, respectivamente. Em A, observa-se fatores transcricionais e reguladores epigenéticos da expressão gênica de miRNAs. Em B, observa-se diferentes circuitos de *feedback* entre fatores transcricionais e miRNAs maduros. TF, fator de transcrição; MYOD1, *myoblast determination protein 1;* p53, *cellular tumor antigen* p53; MYC, m*yc proto-oncogene protein;* ZEB1/2, *zinc finger E-box-binding homeobox* 1/2; DNMTs, DNA *methyltransferases*. Fonte: modificada de Krol, Loedige e Filipowicz (2010).

Uma vez sintetizado e inserido no complexo RISC, os miRNAs irão exercer sua função inibindo a expressão da proteína pelo pareamento imperfeito do miRNA com a região 3'UTR de seus mRNAs alvos (BARTEL, 2009), induzindo a desestabilização do mRNA e/ou a repressão da tradução (GUO et al., 2010; KIM; HAN; SIOMI, 2009; KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010; OLENA; PATTON, 2010). O pareamento (do tipo Watson-Crick) do miRNA com o seu alvo é dado por uma pequena sequência "semente" (do inglês *seed sequence*) que compreende a região entre os nucleotídeos na posição 2 a 8 da extremidade 5' do miRNA (LEITÃO; COSTA; ENGUITA, 2014). Esse pareamento pode variar consideravelmente e influenciar o reconhecimento do miRNA com o seu alvo. Ainda, é importante destacar que, apesar de incomum, já foi descrito na literatura o pareamento de miRNAs com a região 5'UTR de mRNAs alvo, promovendo ou a estimulação (OROM; NIELSEN; LUND, 2008) ou a repressão da tradução (MEIJER et al., 2013). Os principais tipos de reconhecimento podem ser observados na figura 5.



Figura 5 - Tipos de reconhecimento do miRNA com seu respectivo alvo. Sítios de reconhecimento canônicos (*canonical site*) são caracterizados por um pareamento direto entre a sequência semente do miRNA e a região alvo do mRNA compreendendo 6 ou 7 nucleotídeos, além de apresentar o nucleotídeo adenosina na região flanqueada 3' do alvo. Sítios não canônicos (*noncanonical site*) apresentam um pareamento de bases perfeito ou imperfeito na sequência semente que é pelo menos parcialmente compensado pelo pareamento na região 3' final da sequência do miRNA. Fonte: modificada de Leitão, Costa e Enguita (2014).

Em mamíferos, o controle pós-transcricional dos miRNAs ocorre predominantemente pela desestabilização do mRNA alvo, aumentando sua degradação, e consequentemente reduzindo o conteúdo do mRNA alvo (GUO et al., 2010). Por meio de análise *in silico*, estima-se que mais de 60% dos genes humanos codificadores de proteínas sofram regulação por miRNAs (FRIEDMAN et al., 2009). Vale destacar que um simples miRNA pode regular a expressão de centenas de mRNAs, e a expressão de um único mRNA pode ser regulada por múltiplos miRNAs (FERNÁNDEZ-HERNANDO et al., 2013). Assim, os miRNAs estão envolvidos em uma ampla variedade de processos fisiológicos e patológicos (KIRBY; MCCARTHY, 2013).

Além disso, muitos miRNAs são expressos de uma maneira tecido-específica. Este conceito foi confirmado pelo clássico estudo conduzido por Lagos-Quintana et al. (2002), mostrando que a expressão do miR-1, miR-122a e miR-124a eram restritas ao músculo estriado, fígado e cérebro, respectivamente. Atualmente, um miRNA tecido-específico é

definido como um miRNA que tem a sua expressão em determinado tecido pelo menos 20 vezes maior do que nos demais (LEE et al., 2008). Ademais, vários miRNAs, incluindo miR-1, miR-133a e miR-206 são altamente expressos no músculo esquelético (KIM, 2006; SEMPERE et al., 2004). Ainda, tem sido mostrado que a expressão de miR-1, miR-133a, miR-133b e miR-206, correspondem a aproximadamente 25% do total de miRNAs expressos no músculo esquelético, sendo desse modo, conhecidos como miRNAs músculo-específicos ou myomiRs (MCCARTHY et al., 2009). Outros myomiRs já foram descritos, incluindo, miR-208a, miR-208b e miR-499 (VAN ROOIJ et al., 2009). Adicionalmente, os miR-208b e miR-499 que estão localizados em íntrons de genes da miosina, desempenham papel determinante na especificação das características da fibra muscular (VAN ROOIJ et al., 2009).

Para o entendimento da função dos miRNAs e para a identificação de seus respectivos alvos, a utilização de ferramentas de bioinformática tornou-se de fundamental importância. Nesse sentido, inúmeros algoritmos preditores de alvo foram desenvolvidos nos últimos anos. Geralmente, os algoritmos baseiam-se em critérios que levam em consideração o grau de conservação do miRNA entre as espécies, energia livre da ligação entre o mRNA-miRNA, complementaridade com a sequência semente, estabilidade termodinâmica, presença de estruturas secundárias, dentre outros (MIN; YOON, 2010; WITKOS; KOSCIANSKA; KRZYZOSIAK, 2011). Os algoritmos de predição de alvo mais populares são: TargetScan (LEWIS; BURGE; BARTEL, 2005), PicTar (KREK et al., 2005), miRanda (JOHN et al., 2004), PITA (KERTESZ et al., 2007), Rna22 (MIRANDA et al., 2006) e Diana-microT (KIRIAKIDOU et al., 2004). Entretanto, uma vez que não existe uma padronização de critérios para análise realizada pelos algoritmos, muita variabilidade de resultados e algumas limitações são observadas.

Nesse sentido, uma estratégia para contornar a variabilidade intrínseca dos algoritmos preditores de alvo é a utilização de algoritmos múltiplo-preditores (do inglês *multiple-predictors*) (LEITÃO; COSTA; ENGUITA, 2014). Essas aplicações são essencialmente portais da web que agrupam uma série de algoritmos preditores de alvo e representam os resultados de maneira bastante acessível. Dentre estes, destacam-se os múltiplo-preditores miRWalk (DWEEP et al., 2011), miRecords (XIAO et al., 2009) e miRDIP (SHIRDEL et al., 2011). A figura 6 apresenta um uma ilustração dos programas de predição de alvo utilizados pelos algoritmos múltiplo-preditores.



Figura 6 - Diagrama de Venn representando os algoritmos preditores de alvo de miRNAs usados pelos múltiplo-preditores miRWalk, miRecords e miRDIP. Fonte: modificada de Leitão, Costa e Enguita (2014).

Para se ter um panorama geral dos miRNAs descritos como desregulados em doenças humanas, foi desenvolvida (JIANG et al., 2009) uma plataforma denominada miR2Disease (2016), capaz de compilar dados de centenas de trabalhos publicados indicando os miRNAs alterados em doenças humanas, e a relação do miRNA com seus respectivos alvos, dentre outras informações. Atualmente, a plataforma descreve 349 miRNAs relacionados a 163 doenças.

Nos últimos anos, grandes esforços têm sido realizados para documentar o papel dos miRNAs e de seus alvos em diferentes sistemas biológicos e funções celulares, incluindo diferenciação, crescimento, proliferação e apoptose, relacionados em numerosas doenças (KATO; CASTRO; NATARAJAN, 2013). Alterações na expressão de miRNAs são frequentemente observadas em disfunções celulares diversas incluindo resistência à insulina e defeitos na secreção de insulina, participando de alterações da homeostasia da glicose e do desenvolvimento de diabetes (GUAY et al., 2011; GUAY; REGAZZI, 2015; POY; SPRANGER; STOFFEL, 2007; RAFFORT et al., 2015).

Atualmente, são conhecidos diversos miRNAs que estão envolvidos na patogênese e nas complicações diversas do DM (KANTHARIDIS et al., 2011; LORENZEN et al., 2012; SHANTIKUMAR; CAPORALI; EMANUELI, 2012), sobretudo em tecidos que participam diretamente da homeostase glicêmica como células B pancreáticas, fígado, tecidos adiposo e muscular (FERNÁNDEZ-HERNANDO et al., 2013; GUAY et al., 2011; PARK et al., 2013). A figura 7, destaca alguns miRNAs envolvidos na regulação de funções das células B pancreáticas e de tecidos alvo da insulina no contexto do DM.



**Figura 7** - MiRNAs envolvidos na regulação da função de células B e de tecidos alvo da insulina no contexto do diabetes. Fonte: Guay et al. (2011).

Já foi descrito em ratos Goto-Kakizaki (GK - um modelo não obeso de diabetes), que três parálogos do miR-29 (a, b e c) estavam supra-regulados em músculo, tecido adiposo e fígado (HE et al., 2007), e que o miR-24 (HUANG et al., 2009) e o miR10b (HERRERA et al., 2010) estavam reduzidos no músculo esquelético. Também já foi mostrada uma redução na expressão de miR-133a e miR-206 em músculo esquelético de portadores de DM2, e a redução do miR-133a (cinco vezes) correlacionou-se com níveis glicêmicos, índice HOMA e HbA1c (GALLAGHER et al., 2010). Em contrapartida, não foram encontradas diferenças na expressão de miR-1 e miR-133a em músculo esquelético de portadores de diabetes, contudo,

após estimulação com insulina durante 3 h de clamp euglicêmico hiperinsulinêmico, observou-se que vários miRNAs foram infra-regulados, incluindo miR-1 e miR-133a (GRANJON et al., 2009). No entanto, outro estudo (NIELSEN et al., 2010) não encontrou diferença na expressão do miR-1 e miR-133a em resposta a 3 h de clamp euglicêmico hiperinsulinêmico em indivíduos saudáveis. Desse modo, os escassos estudos da literatura apontam discrepâncias quanto à regulação de microRNAs em músculo esquelético de portadores de diabetes, conforme também observado em outras situações (GULLER; RUSSELL, 2010).

Outros estudos têm demonstrado a participação de diversos miRNAs na regulação de proteínas relacionadas à captação de glicose no musculo esquelético em situações de obesidade, resistência à insulina e diabetes. Por exemplo, o miRNA let-7 é capaz de inibir diferentes componentes da via de sinalização insulina-PI3K-*serine/threonine-protein kinase mTOR* (MTOR) no músculo esquelético, por ter como alvo os mRNAs do receptor do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (do inglês *insulin-like growth factor 1 receptor, Igf1r*), do receptor de insulina (do inglês *insulin receptor, Insr*), e do substrato do receptor de insulina 2 (do inglês *insulin receptor substrate 2, Irs2*), resultando em resistência à insulina e intolerância à glicose (ZHU et al., 2011). Além disso, let-7 também foi reportado estar aumentado no músculo esquelético de humanos com DM2 (JIANG et al., 2013).

O miR-16 está aumentado no músculo esquelético de modelos animais de obesidade e DM como rato Zucker e camundongo alimentados com dieta hiperlipídica, e a sua superexpressão em células musculares C2C12 reduz as proteínas MTOR e *ribosomal protein S6 kinase beta-1* (P70S6K1), sugerindo que o miR-16 possa estar envolvido na utilização de glicose (LEE et al., 2016). Adicionalmente, em células C2C12 resistentes a insulina, observou-se um aumento do miR-494 e este foi relacionado com reduções na fosforilação de *TBC1 domain family member 4* (AS160) e P70S6K1, entretanto, nenhum mRNA alvo foi proposto (LEE et al., 2013).

Além disso, outros dois miRNAs, miR-144 e miR-135a, foram descritos como aumentados em músculo esquelético de animais diabéticos, e estes miRNAs regularam respectivamente os mRNAs de *Irs1* e *Irs2* (AGARWAL et al., 2013; KAROLINA et al., 2011). Ainda, recentemente, foi demostrado que o miR-194 reduz em músculo esquelético de indivíduos com DM2 e ratos resistentes à insulina (LATOUCHE et al., 2016); entretanto, contraditoriamente, quando este miRNA foi inibido em células L6, observou-se aumento na captação e oxidação de glicose, síntese de glicogênio e fosforilação de *RAC-alpha serine-* *threonine-protein kinase* (AKT), e nenhum alvo direto foi proposto ou validado para esse miR (LATOUCHE et al., 2016).

Em se tratando de miRNAs reguladores de GLUT4 poucos estudos foram realizados. Até onde conhecemos, cinco estudos descreveram a regulação da expressão de GLUT4 por miRNAs em músculo e três estudos em tecido adiposo.

Em relação ao músculo, Horie et al. (2009), utilizando cardiomiócitos de ratos, observaram que os myomiRs miR-133a e miR-133b reduzem a expressão de GLUT4 e a captação de glicose estimulada por insulina; contudo, por inibir diretamente o fator transcricional KLF15, um conhecido estimulador da transcrição do gene *Slc2a4* (IM et al., 2007). No músculo cardíaco de animais obesos, foi observado um aumento na expressão do miR-29c e uma redução de GLUT4, sugerindo uma relação inversa entre os níveis GLUT4 e o miR-29c; entretanto, esta hipótese necessita ser validada (GUEDES et al., 2015). Ademais, a supra-regulação de miR-29a foi observada em músculo esquelético de ratos que tiveram restrição de crescimento intrauterino (um modelo proposto de resistência à insulina), e, a super-expressão do miR-29a em células musculares C2C12, induziu uma redução de *Slc2a4*/GLUT4 (ZHOU et al., 2016b). Contudo, assim como observado para o miR-29c (GUEDES et al., 2015), o efeito direto de miR-29a sobre a expressão de GLUT4 também precisa ser demonstrado.

Recentemente, um efeito direto do miR-106b sobre o mRNA de *Slc2a4* foi proposto em células musculares L6. Nestas células, a super-expressão de miR-106b reduziu o conteúdo de GLUT4 e diminuiu o consumo e a captação de glicose; por outro lado, a inibição do miR-106b reverteu essa regulação (ZHOU et al., 2016a)

Em outro trabalho, observou-se uma elevação dos níveis de miR-223 em biópsias de ventrículo esquerdo de indivíduos com DM2, e, curiosamente, a super-expressão de miR-223 em cardiomiócitos de ratos neonatais (por meio de transfecção), aumentou a expressão de GLUT4, melhorando a captação de glicose nessas células (LU; BUCHAN; COOK, 2010). Similarmente, elevados níveis de miR-223 foram detectados em tecido adiposo subcutâneo abdominal de mulheres com resistência à insulina, e, uma regulação direta sobre *Slc2a4*/GLUT4 por este miRNA foi demonstrada (CHUANG et al., 2015). Todavia, a super-expressão de miR-223 em adipócitos primários humanos reduziu tanto a captação de glicose estimulada por insulina, quanto o conteúdo proteico de GLUT4 (CHUANG et al., 2015),

revelando um efeito paradoxal quando comparado ao observado em cardiomiócitos (LU; BUCHAN; COOK, 2010).

Em tecido adiposo omental de mulheres com diabetes gestacional, foi observado um aumento na expressão de miR-222 e este aumento foi negativamente correlacionado com os conteúdos do receptor de estrógeno ESR1 (do inglês *estrogen receptor 1*) e do GLUT4, e positivamente correlacionado com os níveis séricos de estradiol (SHI et al., 2014). Além disso, foi demonstrado que o mRNA de *Esr1* foi diretamente regulado pelo miR-222 em células adiposas 3T3-L1, e, o tratamento com estradiol aumentou a expressão de miR-222 e reduziu os conteúdos de ESR1 e GLUT4 (SHI et al., 2014). Adicionalmente, o silenciamento do miR-222 em células 3T3-L1 foi capaz de aumentar a expressão de ESR1 e GLUT4, bem como a captação de glicose estimulada por insulina (SHI et al., 2014). Em relação aos efeitos observados, o nosso laboratório demonstrou que ESR1 é um potente estimulador da expressão de *Slc2a4*/GLUT4 em células 3T3-L1 (CAMPELLO et al., 2012), suportando a hipótese de um efeito mediado por ESR1 na regulação do miR-222 sobre a expressão de GLUT4.

Um elegante estudo foi conduzido por Chen et al. (2013), mostrando que o miR-93 apresentou-se super-expresso no tecido adiposo subcutâneo abdominal de mulheres resistentes à insulina com e sem síndrome do ovário policístico, e que a expressão do miR-93 correlacionou-se negativamente com os níveis de GLUT4 e positivamente com o índice HOMA-IR. Adicionalmente, a super-expressão de miR-93 em ambos adipócitos primários humanos e células 3T3-L1 regulou diretamente (reduziu) a expressão de GLUT4; e, de modo contrário, a inibição de miR-93 aumentou a expressão de GLUT4 (CHEN et al., 2013).

Em relação aos miRNAs reguladores de *HK2* e *GYS1*, os estudos encontrados envolvem, principalmente, câncer. Células tumorais, frequentemente apresentam um fenótipo característico, com reprogramação do metabolismo oxidativo para glicolítico, com aumentada captação de glicose e metabolismo glicolítico acelerado, favorecendo a proliferação celular, fenômeno conhecido como "efeito Warburg" (MATHUPALA; KO; PEDERSEN, 2009; VANDER HEIDEN, 2011). Nesse sentido, o aumento da expressão e atividade da HK2 é característica comum em diversos tipos de câncer, desempenhando papel chave.

Já foram descritas a participação de miRNAs regulando direta e/ou indiretamente HK2 em vários tipos de câncer. Já foi descrito o envolvimento do miR-143 em câncer de próstata (ZHOU; CHEN; LI, 2015) e de mama (JIANG et al., 2012), do miR-199a no carcinoma hepatocelular (GUO et al., 2015; ZHANG et al., 2015), do miR-21 no câncer de bexiga (YANG et al., 2015), do miR-155 no câncer de mama (JIANG et al., 2012) e de pulmão (LV et al., 2016) do miR-4458 no câncer de cólon (QIN et al., 2016), do miR-181b no câncer de estômago (LI et al., 2016) dentre outros. Todos estes miRNAs tiveram como alvo *HK*2.

Já em relação aos miRNAs reguladores do mRNA de *Gys1*, apenas dois estudos foram encontrados. O primeiro estudo observou aumento do miR-17 e redução de *Gys1* após uma sessão de 30 minutos de exercício em amostras de sangue (células mononucleares de sangue periférico) de cavalos de corrida (GIM et al., 2014). Posteriormente, foi validada essa regulação, por meio de ensaio de luciferase, sugerindo a participação do miR-17 na regulação de *Gys1* nesses animais (GIM et al., 2014). Em outro recente estudo, foi demonstrada a participação do miR-564 na inibição de alguns mRNAs envolvidos na sinalização de PI3K/*mitogen activated protein kinase* (MAPK), incluindo *GYS1*, contribuindo para redução proliferação e migração celular no câncer de mama (MUTLY et al., 2016).

Desse modo, considerando o que foi exposto, poucos estudos avaliaram a expressão de microRNAs em tecido muscular esquelético de animais diabéticos, especialmente daqueles que poderiam modular a expressão de *Slc2a4*, que codifica o transportador GLUT4, bem como dos genes envolvidos na fosforilação da glicose e síntese de glicogênio, respectivamente, *Hk2* e *Gys1*. Acreditamos que a compreensão dos miRNAs envolvidos na expressão de genes relacionados a captação e utilização de glicose pelo músculo esquelético contribuirá sobremaneira para o desenvolvimento de novas abordagens preventivas e/ou terapêuticas para os portadores de diabetes mellitus.

#### **2 JUSTIFICATIVA**

Diabetes Mellitus é a doença metabólica com maior prevalência no planeta, sendo responsável por diversas patologias associadas, lesando em bilhões de dólares os sistemas de saúde. Entretanto, apesar do elevado número de estudos que tentam elucidar a doença, muitos dos mecanismos moleculares envolvidos na etiopatogenia e na fisiopatologia ainda permanecem obscuros.

Sabe-se que o músculo esquelético é o principal tecido envolvido na utilização de glicose pelo organismo, e o maior território responsável pela resistência à insulina periférica, contribuindo diretamente para a perda da homeostasia glicêmica, tanto em portadores de DM2, como de DM1 descompensado. Nesse contexto a expressão adequada do transportador de glicose GLUT4 (codificado pelo gene *SLC2A4*) representa etapa fundamental no processo de captação de glicose pelo músculo, uma vez que a captação de glicose fica comprometida principalmente por redução na expressão do transportador. Ademais, outra característica frequentemente observada no diabetes é um prejuízo na metabolização da glicose no músculo, processo no qual as enzimas hexocinase 2 (HK2) e glicogênio sintase (GYS1) desempenham papel determinante.

Recentemente, um novo elemento vem sendo relacionado à etiopatogenia e à fisiopatologia do DM, os microRNAs (miRNAs), e alterações na expressão de miRNAs já foram descritas no DM. No entanto, pouco se conhece a respeito de miRNAs que sejam capazes regular a expressão de *SLC2A4*/GLUT4, bem como das enzimas *HK2*/HK2 e *GYS1*/GYS1 em músculo esquelético de portadores de DM. Acreditamos que a compreensão dos miRNAs potencialmente envolvidos na regulação de mRNAs relacionados a captação e utilização de glicose pelo músculo esquelético contribuirá sobremaneira na criação de estratégias para a prevenção e/ou tratamento da doença.
## **3 OBJETIVOS**

Os objetivos foram divididos conforme a seguir.

3.1 Objetivo geral

Investigar a expressão de miRNAs potencialmente reguladores da expressão de mRNAs relacionados a captação e metabolização da glicose em músculo esquelético de ratos diabéticos.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar por meio de análise *in silico* os miRNAs candidatos a regularem a expressão de *Slc2a4* e mRNAs relacionados ao metabolismo da glicose *Hk2* e *Gys1*.
- Avaliar em músculo esquelético de ratos diabéticos tratados ou não com insulina:
  - A expressão do gene *Slc2a4* e da proteína GLUT4.
  - A expressão dos genes *Hk2* e *Gys1* e das proteínas HK2 e GYS1.
  - A expressão dos myomiRs miR-1, miR-133a, miR-133b e miR-206.
  - A expressão de miRNAs indicados por 4 algoritmos como candidatos a regularem a expressão de *Slc2a4*.
  - A expressão de miRNAs indicados por 3 algoritmos como candidatos a regularem conjuntamente a expressão de *Slc2a4*, *Hk2*, e *Gys1*.
  - A possível correlação entre as variações de expressão dos miRNAs com proteínas GLUT4, HK e GYS1.
  - A possível correlação entre as variações de expressão dos miRNAs com a glicemia, glicosúria e frutosamina plasmática.
  - A possível regulação indireta de *Slc2a4*/GLUT4 por miRNAs.

# **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

Os materiais e métodos foram divididos em diferentes seções conforme a seguir.

#### 4.1 Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, com 70 dias de vida, fornecidos pelo biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) e acomodados no biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Biofísica. Os animais foram devidamente acondicionados sob condições padronizadas de temperatura ambiente  $(23 \pm 2^{\circ} C)$  e ciclo claro/escuro (12/12 h por dia). Água e ração para roedores (Nuvilab CR-1, Nuvital) foram fornecidas *ad libitum*. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no uso de experimentação animal do ICB da USP (protocolo 157/2012).

#### 4.2 Procedimento experimental

Os animais, após período de jejum noturno (± 14 h), e previamente anestesiados com halotano (Tanohalo, Cristália, Itapira, SP, Brasil), receberam uma injeção i.v. de estreptozotocina (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA), 50 mg/kg, solubilizada em tampão citrato 0,1 M (pH 4,5 e injetada na veia peniana), ou apenas tampão citrato no mesmo volume, formando inicialmente dois grupos experimentais: diabéticos (D) e não diabéticos (ND). Treze dias após a droga ser aplicada os animais foram pesados e internados em gaiolas metabólicas por 24 h para avaliação do volume urinário, glicosúria e glicemia caudal. Essas variáveis foram analisadas para a confirmação do estado diabético e para nova divisão dos grupos, totalizando agora 3 grupos experimentais: não diabéticos (ND), diabéticos tratados com placebo (DP) e diabéticos tratados com insulina (DI) por 7 dias, totalizando 21 dias de diabetes. Para a insulinoterapia, foi utilizada a insulina NPH (Lilly, Indianápolis, EUA), administrada via subcutânea, na dose de 6U/dia, sendo 2U pela manhã e 4U no final da tarde, conforme previamente estabelecido pelo nosso laboratório (FREITAS et al., 2009; LIMA, 2011). O grupo DP, recebeu NaCl 0,9% como placebo, no mesmo volume e frequência. Nas últimas 24 h antecedentes à eutanásia, os animais foram internados novamente em gaiola metabólica para avaliação das mesmas variáveis (volume urinário, glicosúria e glicemia caudal). A glicemia caudal foi determinada com a utilização de tiras reativas *Accu-Chek*<sup>®</sup> *Active* (Roche, São Paulo, SP, Brasil).

#### 4.3 Eutanásia e coleta dos tecidos

Ao final do período experimental, entre 8 e 10 hs, com privação alimentar de ~3-4 h, os animais foram pesados e anestesiados com administração de Tiopental sódico – Thiopentax<sup>®</sup> (Cristália, Itapira, SP, Brasil) (50 mg/Kg do peso corporal, via intraperitonial). Após a abolição dos reflexos corneanos e retirada da pata ao estímulo da dor, os animais tiveram os músculos sóleos (direito e esquerdo) removidos, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados à -80 °C para futuras análises. Após a remoção do tecido, os animais foram submetidos à laparotomia mediana para a coleta de sangue (~3 mL) da veia cava inferior, em tubos heparinizados. As amostras sanguíneas foram centrifugadas (2.000 rpm, 4 °C, 15 min) para obtenção de plasma que foi armazenado à -20 °C para posteriores análises.

#### 4.4 Dosagens bioquímicas

As amostras de urina foram utilizadas para determinação da glicose (glicosúria) por meio de método enzimático colorimétrico utilizando kit Glicose Liquiform (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) e amostras de plasma foram utilizadas para avaliar a concentração de Frutosamina por meio de método cinético (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil), em espectrofotômetro Celm<sup>®</sup> (São Paulo, SP, Brasil).

### 4.5 Avaliação de proteínas no músculo (Western blotting)

As amostras foram homogeneizadas em Polytron PT 3.000 KINEMATICA<sup>®</sup> (Brinkman, Lucerna, Suiça) à 25.000 rpm durante 30 s em tampão de homogenização (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; sacarose 250 mM; pH 7,4), acrescidos de inibidores de proteases (aprotinina 15 µg/mL; leupeptina 5 µg/mL; PMSF 174 µg/mL), numa proporção de 1:6 (peso:volume). Posteriormente, foram centrifugadas à 760 g e à 4 °C, por 10 min. O sobrenadante foi armazenado e o precipitado foi ressuspenso em 1/3 do volume de tampão utilizado anteriormente e centrifugado à 760 g e à 4 °C; por 10 min; e os dois sobrenadantes foram somados, obtendo-se o extrato total (adaptado de MITSUMOTO; KLIP, 1992). O extrato total foi utilizado para determinação do conteúdo proteico total pelo emprego de reagente Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE (do inglês *Sodium Duodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli e modificado por Garfin (1990) que envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos para o empacotamento (*stacking* gel) e separação (*resolving* gel) das amostras. Após a corrida, a transferência eletroforética para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (Amersham, Buckinghahmshire, UK) foi realizada, e a membrana foi corada com Ponceau S para controle da quantidade de proteína aplicada. Em seguida, a membrana foi lavada, incubada em solução bloqueadora e posteriormente incubada com o anticorpo de interesse para detecção de GLUT4, HK2, GYS1, RELA, NFKB1 ou phospho-IKK $\alpha/\beta$ , detalhes na tabela 2), seguindo-se posterior processamento para quimioluminescência, conforme realizado rotineiramente em nosso laboratório e previamente descrito (OKAMOTO et al., 2011). A intensidade do sinal correspondente aos "blots" foi expressa em unidades arbitrárias (U.A.), utilizando o programa ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). A densidade das bandas foi normalizada pela densidade da respectiva "lane" na membrana corada com Ponceau.

Anticorpo	Empresa fabricante	Diluição	Identificação/código
anti-GLUT4	Merk Millipore	1:3500	#07-14040
anti-hexocinase 2	Cell Signaling Technology	1:1000	#2867S
anti-glicogênio sintase	Cell Signaling Technology	1:1000	#3886S
anti-RELA	Abcam	1:450	#7970
anti-NFKB1	Cell Signaling Technology	1:1000	#12540S

Tabela 2 - Anticorpos utilizados no estudo

4.6 Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR

A análise dos diferentes mRNAs foi realizada pela técnica de transcrição reversa (do inglês *reverse transcription*, RT) seguida da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real quantitativa (do inglês *quantitative real-time* PCR) (RT-qPCR).

As amostras de músculo foram processadas para extração de RNA total, utilizando o reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conforme as instruções do fabricante. A concentração de RNA foi determinada em espectrofotômetro Epoch<sup>®</sup> (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) e a pureza do RNA estimada pela razão entre as absorbâncias medidas a 260 nm e 280 nm, utilizando somente amostras cuja razão 260/280 fossem acima de 1,8. A integridade do RNA foi confirmada pela verificação do padrão das bandas do RNA ribossomal 28S e 18S, por eletroforese em gel de agarose 1%, visualizado em luz ultravioleta (Epi Chemi II Darkroom, UVP BioImaging Systems, Upland, California, CA, USA).

A reação de transcrição reversa para a síntese do DNA complementar (cDNA), a partir do RNA total, foi realizada utilizando-se *randon primers* (Invitrogen, Carlsbad, USA) e sistema de transcrição reversa ImProm-II<sup>TM</sup> (Promega Corporation, Madison, USA), conforme recomendação do comerciante. Resumidamente, em 1 µg de RNA total foi adicionado: 1 µL de *randon primers* (0,5 µg), 4 µL de *ImProm-II<sup>TM</sup> 5X Reaction Buffer*, 2,4 µL de MgCl<sub>2</sub> (3 mM), 1 µL de dNTP mix (0,5 mM), 1 µL de *ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase* e água livre de nucleases para completar o volume final de 20 µL. As condições da reação de transcrição reversa foram: 10 min à 25 °C, 60 min à 42 °C e 15 min à 72 °C. Os cDNAs obtidos foram armazenados à –20 °C até a realização da qPCR.

Após a transcrição reversa, os cDNAs sintetizados foram amplificados pela qPCR, no aparelho Step One Plus Instrument (Applied Biosystems, Forest City, CA, EUA), utilizando o sistema TaqMan<sup>®</sup> *Gene Expression Assays* (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA), com TaqMan<sup>®</sup> *Universal Master Mix II with UNG* e sondas inventoriadas (mais detalhes na tabela 3). As condições da qPCR foram: 1 ciclo de 2 min à 50 °C; 1 ciclo de 10 min à 95 °C; 40 ciclos de 15 s à 95° C e 1 min à 60 °C. A medida da expressão do gene de interesse (*Slc2a4, Hk2* e *Gys1, Rela, Nfkb1*) foi obtida em relação ao gene de referência (*B2m*) por meio do método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Genes	Iniciadores	Tamanho do	Identificação do
		fragmento (pb)	ensaio TaqMan
Slc2a4	Sense 5' - GGC TGT GCC ATC TTG ATG AC - 3'	75	-
	Anti-sense 5' - CACGAT GGA CAC ATA ACT		
	CAT GGA T - 3'		
	Sonda - 5' FAM AAC CCG CTC CAG CAG C		
	<u>MGB</u> 3'		
Hk2	Sequência não fornecida pela empresa	69	Rn00562457_m1
Gys1	Sequência não fornecida pela empresa	78	Rn01476417_m1
Gapdh	Sequência não fornecida pela empresa	87	Rn99999916_s1
Actb	Sequência não fornecida pela empresa	91	Rn00667869_m1
Hprt1	Sequência não fornecida pela empresa	64	Rn01527840_m1
B2m	Sequência não fornecida pela empresa	58	Rn00560865_m1
Rela	Sequência não fornecida pela empresa	67	Rn01502266_m1
Nfkb1	Sequência não fornecida pela empresa	67	Rn01399572_m1

**Tabela 3 -** Identificação das sondas TaqMan® utilizadas na avaliação dos diferentesgenes por meio da qPCR.

Ressaltamos que avaliamos a expressão de quatro diferentes genes de referência (*Gapdh, Actb, Hprt1* e  $\beta 2m$ ) e fizemos uma análise para determinar o gene mais estável. A análise de estabilidade foi realizada com auxílio da ferramenta denominada "RefFinder" (2013) que faz uma análise individual e posteriormente uma classificação de estabilidade baseada nos principais programas computacionais disponíveis (geNorm, Normfinder, BestKeeper e método Delta Ct). A figura 8 apresenta a classificação dos genes de referência avaliados no presente estudo, que nos levou à escolha do gene *Bm2*.



Figura 8 - "Ranking" apresentado pela ferramenta "RefFinder" mostrando a classificação baseado na estabilidade dos diferentes genes avaliados. rnoB2m: β-2 microglobulina; rnoHPRT1: *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*; rnoGAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; rnoBact: *Actb* (β-actina).

## 4.7 Expressão de microRNAs

As amostras de músculo foram processadas para extração de RNA total, utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conforme as instruções do fabricante. A avaliação dos microRNAs maduros foi feita por RT, seguida da qPCR. O RNA extraído (100ng) foi convertido em cDNA por meio de Kit TaqMan<sup>®</sup> *MicroRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA) juntamente com iniciadores específicos para cada miRNA (ver tabela 3) usando TaqMan<sup>®</sup> *MicroRNA Assays*. As condições da transcrição reversa consistiram de 30 min à 16 °C, 30 min à 42 °C, 5 min à 85 °C e resfriadas à 4 °C. Posteriormente, os cDNAs específicos de cada miRNA foram diluídos e amplificados pela qPCR, utilizando TaqMan<sup>®</sup> 2X *Universal PCR master mix no AmpErase*<sup>®</sup> UNG e sondas específicas para os miRNAs de interesse (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA), conforme instruções do fabricante, e usando Step One Plus Instrument (Applied Biosystems, Forest City, CA, EUA), detalhes na tabela 4. As condições da qPCR foram: 1 ciclo de 10 min à 95 °C; 45 ciclos de 15 s à 95 °C e 1 min à 60 °C.

MicroRNA	Sequência	Identificação do ensaio	Diluição do cDNA	Valor médio do Ct
miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUGUGUAU	002064	30X	23,6
miR-29a	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	002112	30X	25,6
miR-29b	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	000413	30X	33,4
miR-29c	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	000587	30X	31,7
miR-31	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCUG	000185	1X	32,6
miR-93	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG	001090	30X	33,1
miR-106b	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU	000442	30X	30,9
miR-133a	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG	002246	30X	21,6
miR-133b	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUA	002247	30X	21,7
miR-150	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	000473	30X	27,9
miR-186	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU	002285	1X	25,7
miR-199a	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	000498	30X	34,6
miR-206	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG	000510	30X	22,5
miR-338	UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUGA	000548	1X	31
miR-345-3p	CCCUGAACUAGGGGUCUGGAGA	002061	1X	30,6
miR-377	UGAAUCACACAAAGGCAACUUUU	465108_mat	1X	34,5
miR-532-3p	CCUCCCACACCCAAGGCUUGCA	002355	1X	27,6
miR-540	AGGUCAGAGGUCGAUCCUGGGC	461976_mat	1X	30
miR-673	CUCACAGCUCCGGUCCUUGGAG	002054	1X	36,8
miR-874	CUGCCCUGGCCCGAGGGACCGA	002268	1X	31,5
	Genes de referência			
U87	ACAATGATGACTTATGTTTTTGCCGTT TACCCAGCTGAGGGGTTTCTTTGAAGA GAGAATCTTAAGACTGAGC	001712	30X	27,1
4.5S RNA(H)	GCCGGTTGTGGTGGCGCACACCGGTA GGATTTGCTGAAGGAGGCAGAGGCAG GAGGATCACGAGTTCGAGGCCAGCCT	001716	30X	22,4
U6 snRNA	GGGCTACACATTT GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTA AAATTGGAACGATACAGAGAAGATTA GCATGGCCCCTGCGCAAGGATGACAC GCAAATTCGTGAAGCGTTCCATATTTT	001973	30X/1X	26,3/ 20,4

**Tabela 4 -** Informações e sequência dos miRNAs maduros e genes de referência utilizados no<br/>estudo na qPCR pelo sistema TaqMan®.

A estabilidade dos potenciais genes de referência (*U*6, 4.5*S* e *U*87) foi testada e para escolha final do gene de referência (*U*6) foi utilizada a ferramenta denominada "ReFinder" (2013), mais detalhes na figura 9. A expressão relativa dos miRNAs de interesse foi determinada utilizando-se o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).



Figura 9 - "Ranking" apresentado pela ferramenta "RefFinder" mostrando a classificação baseado na estabilidade dos diferentes genes de referência avaliados. U6: U6 snRNA, 4.5S: 4.5S RNA(H).

#### 4.8 Análise in silico

A análise *in silico* foi realizada pela ferramenta denominada "miRWalk" (DWEEP et al., 2011). Dentre as diferentes funções disponibilizadas pelo "miRWalk", destaca-se a predição de miRNAs reguladores de determinado gene alvo, utilizando múltiplos algoritmos preditores (DIANA-mT, miRanda, miRDB, miRWalk, RNAhybrid, PICTAR4, PICTAR5, PITA, RNA22 e TargetScan). No presente estudo, a análise realizada buscou determinar os potenciais miRNAs reguladores da expressão de mRNAs relacionados a captação e utilização de glicose no músculo esquelético: *Slc2a4*, *Hk2* e *Gys1*; além de mRNAs de fatores transcricionais envolvidos na inibição de *Slc2a4*: *Rela*, *Nfkb1*, *Ebf1*, *Nfib*, *Ppara*, *Pparg*.

### 4.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para comparação de três grupos, após análise da normalidade dos dados (teste de Shapiro-Wilk), foi realizada a análise de variância de uma via (ANOVA) ou o teste de Kruskal-Wallis, seguidos dos pós-testes de Bonferroni ou de Dunn, respectivamente. Para resultados envolvendo 3 grupos separados em duplas (ex: tempo 0 e tempo 7 dos diferentes grupos experimentais) foi utilizada ANOVA de duas vias, com pós-teste de Bonferroni. A correlação entre variáveis, quando necessária, foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) ou Spearman ( $\rho$ ), conforme a normalidade de distribuição dos dados. As análises foram realizadas utilizando-se o programa *GraphPad Prism 5.0*. A significância adotada foi de p<0,05.

### **5 RESULTADOS**

Inicialmente, caracterizamos os animais do presente estudo.

A figura 10 apresenta o peso corporal dos diferentes animais. Observou-se uma redução acentuada (p<0,001) deste parâmetro após 14 dias de diabetes, e o tratamento com insulina restaurou parcialmente essa redução.



Figura 10 - Peso corporal dos animais: não diabético (ND, n=22), diabético tratado com placebo (DP, n=25) e diabético tratado com insulina (DI, n=25). Os números 0 e 7 indicam respectivamente às 24hs anteriores ao primeiro e ao último dia de tratamento dos animais DP e DI, respectivamente. Valores expressos em média ± EPM. ANOVA de duas vias: Interação, Tempo e Tratamento significativos (P<0,0001). Pós-teste de Bonferroni: \*\*P<0,01 e \*\*\*P<0,001 vs ND nos respectivos tempos, ###P<0,001 vs DP no respectivo tempo.</li>

Conforme esperado (figura 11), os animais diabéticos aumentaram acentuadamente a glicemia, e o tratamento com insulina induziu pequena redução neste parâmetro (DP: ~482 mg/dL vs DI: ~354 mg/dL).



Figura 11 - Glicemia dos animais: não diabético (ND, n=22), diabético tratado com placebo (DP, n=22) e diabético tratado com insulina (DI, n=23). Os números 0 e 7 indicam respectivamente às 24hs anteriores ao primeiro e ao último dia de tratamento dos animais DP e DI, respectivamente. Valores expressos em média ± EPM. ANOVA de duas vias: Interação, Tempo e Tratamento significativos (P<0,0001). Pós-teste de Bonferroni: \*\*\*P<0,001 vs ND nos respectivos tempos, ###P<0,001 vs DS no respectivo tempo.</li>

Na figura 12 observa-se que os animais diabéticos apresentaram um acentuado aumento do volume urinário (ND: ~4 ml vs DP: ~94 ml), e que o tratamento com insulina induziu uma redução importante na diurese (DI: 24 ml).



Figura 12 - Volume urinário dos animais: não diabético (ND, n=15), diabético tratado com placebo (DP, n=19) e diabético tratado com insulina (DI, n=22). Os números 0 e 7 indicam respectivamente às 24 hs anteriores primeiro e ao último dia de tratamento dos animais DP e DI, respectivamente. Valores expressos em média ± EPM. ANOVA de duas vias: Interação, Tempo e Tratamento significativos (P<0,0001). Pós-teste de Bonferroni: \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 vs ND nos respectivos tempos, <sup>###</sup>P<0,001 vs DS no respectivo tempo.</li>

O último parâmetro avaliado foi a glicosúria de 24 h (figura 13), um indicativo do controle glicêmico ao longo do dia. Os animais com diabetes apresentaram uma forte glicosúria, e, a insulinoterapia reduziu marcadamente (80%) este parâmetro.



**Figura 13** - Glicosúria de 24 hs dos animais: não diabético (ND, n=15), diabético tratado com placebo (DP, n=19) e diabético tratado com insulina (DI, n=21). Os números 0 e 7 indicam respectivamente às 24 hs anteriores ao último dia de tratamento dos animais DP e DI. Valores expressos em média  $\pm$  EPM. ANOVA de duas vias: Interação, Tempo e Tratamento significativos (P<0,0001). Pós-teste de Bonferroni: \*\*\*P<0,001 vs ND nos respectivos tempos, <sup>###</sup>P<0,001 vs DS no respectivo tempo.

Uma vez que a glicemia é um parâmetro rapidamente modulável, avaliamos também os níveis plasmáticos de frutosamina, um marcador que reflete o controle glicêmico das últimas 2 a 3 semanas. A figura 14 mostra que animais diabéticos apresentaram um aumento (P<0,001) de frutosamina, e o tratamento com insulina foi capaz de reduzir este parâmetro, indicando uma melhora no controle glicêmico desses animais, semelhantemente ao observado na glicosúria de 24 h.



Figura 14 - Frutosamina plasmática dos animais: não diabético (ND, n=11), diabético tratado com placebo (DP, n=9) e diabético tratado com insulina (DI, n=9). Valores expressos em média ± EPM. One-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni: \*\*\*P<0,001 vs ND; #P<0,05 vs DS.</p>

Assim, constata-se que os animais diabéticos desenvolveram alterações metabólicas características do estado diabético, o que foi significativamente melhorado pelo tratamento com insulina.

Após a caracterização dos animais, avaliamos, variáveis moleculares relacionadas ao transporte e utilização de glicose pelo músculo sóleo. A expressão gênica do mRNA *Slc2a4* (figura 15A) reduziu no diabetes (~55%), e a insulinoterapia restabeleceu completamente este parâmetro. Regulação exatamente igual foi observada na expressão da proteína GLUT4 (figura 15, painéis B e C).



Figura 15 - Expressão de Slc2a4/GLUT4 em músculo sóleo dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Em A, resultados da expressão gênica; Em B, "blots" representativos da proteína GLUT4 e da membrana corada com Ponceau; Em C, resultados expressos por µg de proteína submetida à eletroforese. Valores expressos em média ± EPM de 9 a 12 animais por grupo. One-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni: \*\*\*P<0,001 vs ND; <sup>###</sup>P<0,001 vs DP. UA= unidades arbitrárias; µg= micrograma.

A figura 17 mostra a regulação das enzimas HK2 e GYS1. Observa-se que o diabetes reduziu (~46%) a expressão dos mRNAs Hk2 (painel A) e Gys1 (painel B), e a insulinoterapia recuperou parcialmente a expressão de Hk2 (painel A) e totalmente a de Gys1 (painel B). Semelhante regulação foi observada nas proteínas HK2 e GYS1 (painéis C, D, E e F).



Figura 16 - Expressão de Hk2/HK2 e Gys1/GYS1 em músculo sóleo dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Em A e B, resultados da expressão gênica; Em C e E, "blots" representativos das proteínas HK2 e GYS1 e das membranas coradas com Ponceau, respectivamente; Em D e F, resultados expressos por µg de proteína submetida à eletroforese. Valores expressos em média ± EPM de 7 a 11 animais por grupo. One-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni: \*P<0,05, \*\*P<0,01 e \*\*\*P<0,001 vs ND; \*P<0,05, \*\*P<0,01 e ###P<0,001 vs DP. UA= unidades arbitrárias; µg= micrograma.</p>

Em seguida fomos determinar por meio de análise *in silico* os miRNAs preditos como potenciais reguladores de *Slc2a4*/GLUT4 em rato.

A análise *in silico* pela ferramenta denominada "miRWalk" revelou que, dentre os algoritmos preditores, quatro identificaram miRNAs candidatos a regularem *Slc2a4* em rato. A figura 17 apresenta um diagrama de Venn (empilhado) mostrando os conjuntos de miRNAs preditos por 1 (conjunto D), 2 (conjunto C), 3 (conjunto B) e 4 (conjunto A) algoritmos. Conforme visualizado, apenas 3 miRNAs foram preditos pelos 4 algoritmos (miRanda, miRDB, miRWalk e TargetScan); 28 miRNAs foram preditos por 3 algoritmos (miRanda, miRWalk e TargetScan); 11 miRNAs por 2 algoritmos (combinações: miRanda e TargetScan; ou miRanda e miRWalk ou miRWalk e TargetScan) e 60 miRNAs por apenas 1 algoritmo (miRanda; TargetScan ou miRWalk), totalizando 102 miRNAs candidatos a regularem *Slc2a4* em rato.



Figura 17 - Diagrama de Venn empilhado mostrando os miRNAs candidatos a regularem *Slc2a4* em rato, de acordo com o número de algoritmos que fazem esta indicação. Em A, miRNAs preditos por 4 algoritmos (miRanda, miRDB, miRWalk e TargetScan), em B, miRNAs preditos por 3 algoritmos (miRanda, miRWalk e TargetScan), em C, miRNAs preditos por 2 algoritmos (miRanda e TargetScan; miRanda e miRWalk ou miRWalk e TargetScan), em D, miRNAs preditos por 1 algoritmo (miRanda; TargetScan ou miRWalk). Os miRNAs destacados em negrito, foram avaliados no estudo.

Outra análise realizada foi a nuvem de palavras, na qual, quanto maior for a fonte da palavra na nuvem, mais vezes esta palavra foi citada em determinado contexto. Desta mesma maneira, apresentamos a análise dos miRNAs preditos como reguladores de *Slc2a4*, levando em consideração o número de algoritmos que apontaram a relação miRNA/*Slc2a4*. Para a presente análise, utilizamos o programa denominado Wordle (2015). A figura 18 apresenta a "nuvem de miRNAs" candidatos a regularem a expressão do gene *Slc2a4* em rato.



Figura 18 - "Nuvem de miRNAs" candidatos a regularem Slc2a4 em rato.

Assim como realizado para *Slc2a4*/GLUT4, também determinamos por meio de análise *in silico*, os miRNAs candidatos a regularem a expressão de enzimas relacionadas a utilização de glicose pelo músculo esquelético, *Hk2*/HK2 e *Gys1*/GYS1.

Dentre os algoritmos utilizados para análise, quatro indicaram miRNAs candidatos a regularem o mRNA de *Hk2*/HK2 em rato. A figura 19 apresenta o diagrama de Venn (empilhado) mostrando os conjuntos de miRNAs preditos por 1 (conjunto D), 2 (conjunto C), 3 (conjunto B) e 4 (conjunto A) algoritmos. Das centenas de miRNAs preditos a regularem *Hk2* (190 miRNAs), 1 miRNA foi predito por 4 algoritmos (miRanda, miRDB, miRWalk e PITA), 19 miRNAs por 3 algoritmos (miRanda, miRWalk e PITA), 30 miRNAs por 2 algoritmos (miRanda e miRWalk ou miRanda e PITA) e 140 miRNAs por apenas 1 algoritmo (miRanda ou PITA).



Figura 19 - Diagrama de Venn empilhado mostrando os miRNAs candidatos a regularem *Hk2* em rato, de acordo com o número de algoritmos que fazem esta indicação. Em A, miRNAs preditos por 4 algoritmos (miRanda, miRDB, miRWalk e PITA), em B, miRNAs preditos por 3 algoritmos (miRanda, miRWalk e PITA), em C, miRNAs preditos por 2 algoritmos (miRanda e miRWalk ou miRanda e PITA), em D, miRNAs preditos por 1 algoritmo (miRanda ou PITA). Os miRNAs destacados em negrito, foram avaliados no estudo.

A figura 20 apresenta a "nuvem de miRNAs" candidatos a regularem a expressão de *Hk2* em rato. Lembrando que quanto maior a fonte do miRNA na "nuvem", mais algoritmos o predisseram como alvo de *Hk2*.



Figura 20 - "Nuvem de miRNAs" candidatos a regularem Hk2 em rato.

Na regulação de *Gys1*/GYS1, três algoritmos indicaram miRNAs candidatos a regularem este alvo. A figura 21 mostra o diagrama de Venn (empilhado) indicando os conjuntos de miRNAs preditos por 1 (conjunto C), 2 (conjunto B) e 3 (conjunto A) algoritmos. Observa-se que 2 miRNAs foram preditos regularem *Gys1* por 3 algoritmos (miRDB, miRWalk e TargetScan), 31 miRNAs por 2 algoritmos (miRWalk e TargetScan) e 32 miRNAs por 1 algoritmo (miRDB; miRWalk ou TargetScan), totalizando 65 miRNAs candidatos a modularem o mRNA de *Gys1*.



Figura 21 - Diagrama de Venn empilhado mostrando os miRNAs candidatos a regularem Gys1 em rato, de acordo com o número de algoritmos que fazem esta indicação. Em A, miRNAs preditos por 3 algoritmos (miRDB, miRWalk e TargetScan), em B, miRNAs preditos por 2 algoritmos (miRWalk e TargetScan), em C, miRNAs preditos por 1 algoritmo (miRDB; miRWalk ou TargetScan). Os miRNAs destacados em negrito, foram avaliados no estudo.

A figura 22 apresenta a "nuvem de miRNAs" candidatos a regularem Gys1 em rato.



Figura 22 - "Nuvem de miRNAs" candidatos a regularem Gys1 em rato.

Como visualizado acima, uma grande quantidade de miRNAs (mais precisamente 357 miRNAs) foram preditos como candidatos a regularem *Slc2a4*, *Hk2* e *Gys1* em rato. Escolhemos inicialmente avaliar os miRNAs altamente expressos em músculo esquelético, os miRNAs miR-1, miR-206, miR-133a e miR-133b, denominados myomiRs.

A figura 23, apresenta a expressão do miR-1 (painel A) e miR-206 (painel B). Observa-se que animais diabéticos apresentaram aumento (~28%) na expressão do miR-1 (p<0,05), o que não se alterou após tratamento com insulina. Apesar dos miR-1/206 serem considerados da mesma família (apresentarem a mesma sequência semente) e diferirem por apenas 4 nucleotídeos, nenhuma alteração significativa foi observada na expressão de miR-206.



Figura 23 - Expressão do miR-1 (painel A) e miR-206 em músculo sóleo dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM de 6 a 8 animas por grupo. UA= unidades arbitrárias. One-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni: \*P<0,05 vs ND.</p>

Avaliamos também a expressão do miR-133a (figura 24A) e miR-133b (figura 24B) que não se alterou em nenhuma condição.



Figura 24 - Expressão de miR-133a (painel A) e miR-133b (painel B) em músculo sóleo dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM de 7 a 8 animais por grupo. UA= unidades arbitrárias.

Posteriormente, fomos avaliar os miRNAs preditos regularem *Slc2a4* indicados por 4 algoritmos (conjunto A da figura 17). A figura 25 mostra que a expressão do miR-874 aumentou apenas no grupo diabético tratado com insulina (painel A). Já o miR-345-3p reduziu no diabetes, e se recuperou com a insulinoterapia (painel B). O miR-31 (painel C) não se alterou.



Figura 25 - Expressão do miR-874 (painel A), miR-345-3p (painel B) e miR-31 (painel C) em músculo sóleo dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM de 6 a 8 animais por grupo. UA= unidades arbitrárias. *One-way* ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni: \*\*P<0,01 e \*\*\*P<0,001 vs ND; <sup>#</sup>P<0,05 vs DP.</p>

Dado o elevado número de miRNAs preditos regularem *Slc2a4* indicados por 3 algoritmos, escolhemos avaliar alguns miRNAs, baseando-se em trabalhos já publicados na literatura indicando que eles se alteram em situação de diabetes, e/ou por serem expressos em músculo. Desse modo, selecionamos mais 6 miRNAs.

A figura 26 mostra a expressão dos miRNAs da família miR-29, miR-29a (painel A), miR-29b (painel B) e miR-29c (painel C). O diabetes aumentou significativamente a expressão dos miR-29b (~118%) e miR-29c (~51%), enquanto a insulinoterapia reverteu completamente apenas os níveis do miR-29b (painel B).



Figura 26 - Expressão do miR-29a (painel A), miR-29b (painel B) e miR-29c (painel C) em músculo sóleo dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM de 6 a 8 animais por grupo. UA= unidades arbitrárias. *One-way* ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni: \*\*P<0,01 vs ND; <sup>##</sup>P<0,01 vs DP.</p>

A figura 27 mostra a expressão do miR-93 (painel A), miR-106b (painel B) e miR-199a (painel C). Observa-se que o diabetes reduziu a expressão dos miR-93 (~39%) e miR-199a (~30%), e, a insulinoterapia reverteu apenas os níveis do miRNA-199a (painel C).



Figura 27 - Expressão do miR-93 (painel A), miR-106b (painel B) e miR-199a (painel C) em músculo sóleo dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM de 7 a 8 animais por grupo. UA= unidades arbitrárias. *One-way* ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni ou teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn: \*P<0,05 e \*\*P<0,01 vs ND; \*P<0,05 vs DP.</p>

Posteriormente, aprofundando a análise *in silico*, fomos verificar se existia alguma relação entre os miRNAs candidatos a regularem *Slc2a4*, *Hk2* e *Gys1*. Conforme mostrado no diagrama de Venn (figura 28), das centenas de miRNAs candidatos, 11 foram comuns aos 3 genes. Além disto, 48 miRNAs foram preditos regularem *Slc2a4* e *Hk2*, 16 foram preditos regularem *Hk2* e *Gys1* e 11 foram preditos regularem *Slc2a4* e *Gys1*.



Figura 28 - Diagrama de Venn mostrando os miRNAs candidatos a regularem *Slc2a4*, *Hk2* e *Gys1* em rato.

Na sequência, buscamos relacionar os miRNAs preditos regularem *Slc2a4* por 4 e 3 algoritmos (figura 17, conjuntos A e B) com os miRNAs candidatos a regularem *Hk2* e *Gys1*. Conforme observado no diagrama de Venn (figura 29), dos 31 miRNAs preditos regularem *Slc2a4* por 4 e 3 algoritmos: apenas 1 relacionou-se com *Gys1*, 14 relacionaram-se com *Hk2* e 7 miRNAs relacionaram-se com *Hk2* e *Gys1*, sendo esses últimos os miR-150, miR-186, miR-338, miR-377, miR-532-3p, miR-540 e miR-673. Passamos a investigar esses 7 miRNAs.



Figura 29 - Diagrama de Venn demonstrando os miRNAs candidatos a regularem Slc2a4 preditos por 4 e 3 algoritmos e a relação com os miRNAs candidatos a regularem os genes Hk2 e Gys1 em rato.

A figura 30 mostra que a expressão dos miR-377 (painel A) e miR-186 (painel B) aumentou apenas nos animais diabéticos submetidos à insulinoterapia, quando comparados aos diabéticos. Além disso, salientamos que o músculo apresentou uma expressão muito baixa do miR-377, com um *threshold cicle* (ct) no RT-qPCR de ~35.



Figura 30 - Expressão do miR-377 (painel A) e miR-186 (painel B) em músculo sóleo dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM de 5 a 9 animais por grupo. U.A.= unidades arbitrárias. One-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni ou teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn: <sup>#</sup>P<0,05 vs DP.</p>

A figura 31 revela que a expressão dos miR-673 (painel A), miR-338 (painel B) e miR-540 (painel C) não se alterou nas condições investigadas. Mais uma vez ressaltamos que o miR-673 quase não foi detectado no músculo (ct de ~37).



Figura 31 - Expressão do miR-673 (painel A), miR- 338 (painel B) e miR-540 (painel C) em músculo sóleo dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM de 3 a 8 animais por grupo. U.A.= unidades arbitrárias.

Por fim, completamos a avaliação na figura 32. Observa-se que o diabetes reduziu a expressão do miR-532-3p (26%, painel A) e do miR-150 (32%, painel B), e a insulinoterapia restaurou apenas a expressão miR-532-3p.



Figura 32 - Expressão do miR-345-3p (painel A) e miR-150 (painel B) em músculo sóleo dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM de 6 a 8 animais por grupo. U.A.= unidades arbitrárias. One-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni: \*P<0,05, \*\*P<0,01 e \*\*\*P<0,001 vs ND; #P<0,05 vs DP.</li>

Assim, dos 20 miRNAs avaliados neste estudo, oito apresentaram-se alterados no músculo esquelético dos animais diabéticos. Destes, três tiveram a expressão aumentada, enquanto cinco tiveram diminuída.

Considerando o importante papel dos miRNAs sobre a tradução de mRNAs alvos, geralmente desestabilizando-os e reduzindo a tradução de proteínas, avaliamos a possível relação causal entre as alterações observadas na expressão dos miRNAs e as alterações de conteúdo de proteínas alvos (tabela 5) e de variáveis metabólicas relacionadas ao diabetes (tabela 6) detectadas. O detalhamento dessa análise pode ser consultado no apêndice A.

*	r ou p	Р
Com o transportador GLUT4		
miR-1	-0,37	0,066
miR-29b	-0,64	0,0006
miR-29c	-0,50	0,011
miR-93	0,16	0,43
miR-150	0,13	0,53
miR-199a	0,45	0,30
miR-345-3p	0,38	0,068
miR-532-3p	0,54	0,006
Com a enzima hexocinase 2 (H	K2)	
miR-1	-0,25	0,22
miR-29b	-0,41	0,043
miR-29c	-0,49	0,013
miR-93	0,001	0,99
miR-150	0,13	0,51
miR-199a	0,48	0,019
miR-345-3p	0,03	0,89
miR-532-3p	0,60	0,002
Com a enzima glicogênio sintas	se 1 (GYS1)	
miR-1	-0,52	0,008
miR-29b	-0,53	0,007
miR-29c	-0,50	0,011
miR-93	0,21	0,31
miR-150	0,01	0,94
miR-199a	0,20	0,35
miR-345-3p	0,01	0,98
miR-532-3p	0,37	0,07

 Tabela 5 - Correlação entre miRNAs e proteínas codificadas por mRNAs potencialmente alvos alterados pelo diabetes no músculo esquelético.

A correlação foi avaliada pelo coeficiente de Pearson (r) ou de Spearman ( $\rho$ ), conforme a distribuição das amostras, e os valores de P<0,05 estão destacados em negrito.

	r ou p	Р
Com a glicemia		
miR-1	0,28	0,14
miR-29b	0,54	0,002
miR-29c	0,55	0,002
miR-93	-0,18	0,34
miR-150	-0,24	0,21
miR-199a	-0,63	0,001
miR-345-3p	-0,58	0,001
miR-532-3p	-0,54	0,002
Com a glicosúria de 24 hs		
miR-1	0,22	0,32
miR-29b	0,45	0,03
miR-29c	0,41	0,059
miR-93c	-0,33	0,13
miR-150	-0,27	0,21
miR-199a	-0,56	0,01
miR-345-3p	-0,62	0,003
miR-532-3p	-0,67	0,001
Com a frutosamina plasmática		
miR-1	0,29	0,29
miR-29b	0,44	0,097
miR-29c	0,26	0,36
miR-93	-0,50	0,059
miR-150	0,24	0,39
miR-199a	-0,78	0,003
miR-345-3p	-0,81	0,0004
miR-532-3p	-0,72	0,004

Tabela 6 - Correlação entre variáveis metabólicas e miRNAs alterados pelo diabetes.

A correlação foi avaliada pelo coeficiente de Pearson (r) ou de Spearman ( $\rho$ ), conforme a distribuição das amostras, e os valores de P<0,05 estão destacados em negrito.

Em resumo, destaca-se que os níveis proteicos de GLUT4, HK2 e GYS1 correlacionaram-se negativamente com a expressão dos miR-29b e miR-29c, sugerindo uma relação causal entre essas variáveis, na qual o diabetes aumenta miR-29b/c o que contribui para a redução de GLUT4/HK2/GYS1; a insulinoterapia reverte essa regulação. Ainda, observa-se que tanto GLUT4 como HK2 correlacionaram-se positivamente com miR-199a e miR-532-3p, indicando uma possível regulação indireta sobre GLUT4 e HK2 por meio destes miRNAs. Finalmente, em relação às variáveis metabólicas, observa-se que as três variáveis metabólicas analisadas correlacionaram-se positivamente com miR-29b e miR-29c, e negativamente com miR-199a, miR-345-3p e miR-532-3p, ressalvando que a correlação entre glicosúria e miR-29c mostrou uma significância marginal (P=0,059).

Considerando a possibilidade de regulação indireta sobre a expressão de *Slc2a4*/GLUT4 por meio dos miRNAs diminuídos no diabetes, sobretudo daqueles que se correlacionaram positivamente com GLUT4, ampliamos a análise para determinar se os miRNAs alterados também tinham como alvo comum potenciais repressores de *Slc2a4*. Assim, fizemos a análise *in silico* para verificar se *Nfkb1* e *Rela*, dois membros da família de NFKB, que atuam como fatores transcricionais inibitórios sobre a expressão de *Slc2a4*, eram alvo de miRNAs avaliado no estudo.

A análise identificou que *Nfkb1* era predito como alvo de miR-93 e miR-199a, enquanto que *Rela* foi predito como alvo dos cinco miRNAs diminuídos pelo diabetes (miR-93, miR-150, miR-199a, miR-345-3p e miR-532-3p). Assim, fomos avaliar a expressão de *Nfkb1*/NFKB1 e *Rela*/RELA em músculo esquelético dos animais dos diferentes grupos experimentais.

A figura 33 apresenta a expressão de *Nfkb1*/NFKB1. Como observado, não houve alteração na expressão de *Nfkb1* (painel A), porém, o diabetes aumentou (61%) o conteúdo proteico de NFKB1 e a insulinoteparia reverteu completamente essa alteração (painéis B e C).



Figura 33 - Expressão de *Nfkb1*/NFKB1 em músculo sóleo dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Em A, resultados da expressão gênica; Em B, "blots" representativos da proteína NFKB1 e da membrana corada com Ponceau; Em C, resultados expressos por µg de proteína submetida a eletroforese. Valores expressos em média ± EPM de 7 a 11 animais por grupo. One-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni: \*P<0,05 vs ND; #P<0,05 vs DP. UA= unidades arbitrárias; µg= micrograma.</p>

A figura 34 mostra a expressão de *Rela*/RELA. Diferentemente do observado na proteína NFKB1, nenhuma alteração foi detectada na expressão da proteína RELA (painéis B e C).


Figura 34 - Expressão de *Rela*/RELA em músculo sóleo dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Em A, resultados da expressão gênica; Em B, "blots" representativos da proteína RELA e da membrana corada com Ponceau; Em C, resultados expressos por μg de proteína submetida a eletroforese. Valores expressos em média ± EPM de 7 a 11 animais por grupo. UA= unidades arbitrárias; μg= micrograma.

Esses resultados demonstram que pode haver um efeito indireto sobre a expressão de *Slc2a4*/GLUT4, por meio do aumento na expressão de NFKB1 induzido pelo diabetes. Adicionalmente, o efeito indireto pode ser através de outros fatores transcricionais, como: O/E-1, NF1B, PPARalfa e PPARgama, que já foram demonstrados ter efeito repressor sobre a expressão de *Slc2a4*.

No sentido de avaliar se esses repressores de *Slc2a4* são alvos dos miRNAs que se apresentaram diminuídos no diabetes, nova análise *in silico* foi realizada (tabela 7).

	miR-93	miR-150	mi <b>R-199</b> a	miR-345-3p	miR-532-3p
Nfkb1	X		Х		
Rela	X	X	Х	Х	Х
Ebf1	Х	Х	Х		Х
Nfib	Х		Х		
Ppara	Х			Х	
Pparg	Х				

Tabela 7 - Indicação dos miRNAs preditos como reguladores de fatores transcricionais de efeitoinibitório sobre Slc2a4/GLUT4.

*Nfkb1*, nuclear factor kappa B subunit 1; Rela, RELA proto-oncogene, NF-kB subunit; Ebf1, early B cell factor 1; Nfib, nuclear factor 1B; Ppara, peroxisome proliferator activated receptor alpha; Pparg, peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

## 6 DISCUSSÃO

Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho a investigar os miRNAs potencialmente reguladores da expressão de genes relacionados à utilização de glicose em músculo esquelético de ratos diabéticos. Os animais diabéticos apresentaram prejuízos nas variáveis metabólicas, drástica redução na expressão de *Slc2a4*/GLUT4, *Hk2*/HK2 e *Gys1*/GYS1, a insulinoterapia melhorou o controle glicêmico e restaurou de maneira parcial ou completa estas variáveis. O diabetes e/ou o tratamento com insulina, modularam de maneira importante inúmeros miRNAs: incluindo miR-1, miR-29b, miR-29c, miR-93, miR-199a, miR-345-3p, miR-532-3p e miR-150; muitos dos quais preditos a regularem não apenas o mRNA *Slc2a4*, mas também os mRNAs *Hk2* e *Gys1*. Importantemente, os níveis proteicos de GLUT4, HK2 e GYS1 correlacionaram-se significativamente com a expressão do miR-29b, miR-29c, miR-199a e miR-532-3p, e também com as variáveis metabólicas. Ainda, a regulação indireta da expressão de *Slc2a4*/GLUT4 por miRNAs, parece envolver o fator transcricional NFKB.

Para indução do diabetes utilizamos a droga estreptozotocina (BALAMURUGAN et al., 2003), capaz de provocar diminuição na síntese e secreção de insulina (dependendo da dose) e consequentemente hiperglicemia (SZKUDELSKI, 2001). No presente estudo, o diabetes desenvolveu-se conforme esperado (perda de peso, poliúria, glicosúria e hiperglicemia). Ademais, observamos elevação da frutosamina plasmática, um importante indicador de hiperglicemia nas últimas 2 a 3 semanas (LEE, 2015; YOUSSEF et al., 2008), e que, em humanos, correlaciona-se fortemente com a glicemia de jejum e a dosagem de hemoglobina glicada (BAKER et al., 1985; PANDY et al., 1987). Ainda, o tratamento por 7 dias com insulina foi capaz de melhorar todos as variáveis acima citadas em relação ao grupo tratado com placebo. Todavia, vale destacar que apesar da melhora significativa observada nos animais insulinizados, eles continuaram hiperglicêmicos (~354 mg/dL).

Outro efeito observado no diabetes foi a diminuição na expressão de *Slc2a4* (cerca de 55%), gene este fundamental para o controle metabólico; ainda, a insulinoterapia por 7 dias restabeleceu completamente este prejuízo. A diminuição da expressão do mRNA do *Slc2a4* já foi observada em músculo de animais diabéticos com as mesmas características do músculo investigado no presente estudo (composto predominantemente por fibras vermelhas, oxidativas) (CAMPS et al., 1992; NEUFERS; CAREY; DOHM, 1993; RICHARDSON et al., 1991). Ainda, a diminuição na expressão de *Slc2a4* pelo diabetes, bem como a reversão desse

quadro com a insulinoterapia em músculo sóleo, foi recentemente observada em nosso laboratório (LIMA, 2011); efeito também observado em *pool* de músculos compostos de fibras oxidativas/glicolíticas (RICHARDSON et al., 1991).

Acompanhando a regulação do mRNA, a proteína GLUT4 foi semelhantemente modulada; os animais diabéticos tiveram redução marcante da proteína (~77%), bem como uma reversão desse quadro com a insulinoterapia. Diferentes estudos utilizando modelos experimentais de diabetes e em sujeitos obesos e/ou portadores de DM2, já demonstraram a redução no conteúdo de GLUT4 em músculo esquelético, contribuindo diretamente para o prejuízo na captação de glicose nessas condições (CAMPS et al., 1992; DOHM et al., 1991; GASTER et al., 2001; HARDIN; DOMINGUEZ; GARVEY, 1993; MACHADO; SHIMIZU; SAITO, 1993). Além disso, o nosso laboratório já demonstrou, similarmente ao presente estudo, a eficiência do tratamento com insulina para recuperação dos níveis proteicos de GLUT4 no diabetes (LIMA, 2011; OKAMOTO et al., 2011).

Além de *Slc2a4*/GLUT4, o diabetes diminuiu de maneira importante a expressão de *Hk2*/HK2 (~49%), enzima responsável pela fosforilação de glicose no músculo esquelético. O tratamento com insulina recuperou parcialmente a expressão de *Hk2* e completamente o conteúdo de HK2. Prejuízos na utilização de glicose pelo músculo esquelético é característica frequentemente observada no diabetes, e, a insulina atua de maneira direta nessa regulação (KELLEY; MOKAN; MANDARINO, 1992; PENDERGRASS et al., 1998; SHULMAN et al., 1990). Já foram demonstrados prejuízos na atividade e/ou expressão de *Hk2*/HK2 em músculo esquelético de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, apesar destes estudos não indicarem o músculo avaliado (BASHA et al., 2014; EL-SHAZLY et al., 2015). Ainda, esses prejuízos também foram observados em portadores de DM2 e obesos (PENDERGRASS et al., 1998; VESTERGAARD et al., 1995). Além disso, a capacidade da insulina em aumentar a atividade e a expressão de *Hk2* é marcadamente reduzida em portadores de DM2 em relação aos indivíduos controle (VOGT et al., 2000).

Similarmente, o diabetes reduziu marcadamente (~48%) a expressão de *Gys1*/GYS1, e, a insulinoterapia por 7 dias normalizou a expressão desta enzima. Diminuições na atividade da glicogênio sintase com consequente redução no conteúdo de glicogênio no músculo e no fígado foram descritas em modelos experimentais de diabetes (BASHA; SANKARANARAYANAN, 2014; CHANDRAMOHAN et al., 2015), assim como diminuição na atividade e no mRNA da *Gys1* no músculo esquelético de portadores de DM2 (VESTERGAARD et al., 1993). Ademais, o prejuízo na síntese de glicogênio sob estimulo insulínico também é observada em vários estados de resistência à insulina, incluindo obesidade, intolerância à glicose e diabetes; contribuindo para a perda da homeostasia glicêmica (GROOP et al., 1989; KELLEY; MOKAN; MANDARINO, 1992; SHULMAN et al., 1990; VIND et al., 2012).

Inicialmente, foi avaliada a expressão de quatro myomiRs (miR-1, miR-133a, miR-133b e miR-206), que já foram descritos como alterados pelo diabetes e/ou pela insulina e/ou pelo exercício físico (GALLAGHER et al., 2010; GRANJON et al., 2009; RUSSELL et al., 2013). Detectamos apenas aumento na expressão do miR-1 nos animais diabéticos e o tratamento por 7 dias com insulina, não foi capaz de restabelecer a expressão deste miRNA. O miR-1 já foi descrito aumentado em animais diabéticos (GRANJON et al., 2009), o que reverteu em resposta a 2 injeções de insulina, tecido colhido 24 h após a primeira injeção. Ainda, esse estudo foi realizado em camundongos, e o músculo estudado foi o gastrocnêmio. Adicionalmente, no mesmo estudo, não foi observada alteração no miR-1 de pacientes portadores de DM2 submetidos a 3 h de clamp euglicêmico hiperinsulinêmico (GRANJON et al., 2009); e, semelhantemente, Gallagher et al. (2010) também não observaram alterações na expressão do miR-1 em indivíduos normoglicêmicos, intolerantes a glicose ou diabéticos tipo 2. Finalmente, um recente estudo demonstrou redução na expressão do miR-1 em músculo sóleo de camundongos obesos com resistência à insulina alimentados com dieta hiperlipídica por 8 e 12 semanas (FRIAS et al., 2016). Em conjunto, estes estudos demonstram que a regulação do miR-1 no diabetes parece ser muito variável.

Baseado na análise *in silico*, 4 algoritmos indicaram 3 miRNAs como reguladores de *Slc2a4*. Destes, apenas o miR-345-3p alterou-se (redução) com o diabetes o que reverteu com a insulinoterapia. O miR-345 é um importante miRNA envolvido em alguns tipos de câncer, incluindo redução na expressão em câncer de pâncreas (SRIVASTAVA et al., 2015) e de próstata (CHEN et al., 2015). Em tecido cardíaco de animais diabéticos (camundongos Akita, um modelo semelhante ao DM1), foi observada redução na expressão do miR-345 em *array* de miRNAs, todavia, não foi realizada a validação desta redução (CHAVALI; TYAGI; MISHRA, 2014). Além disso, redução na expressão de miR-345 também foi observada em mioblastos isolados de pacientes com distrofia muscular do tipo fácio-escápulo-umeral; neste estudo, o miR-345 não sofreu alteração mesmo após a diferenciação destas células para miotubos (DMITRIEV et al., 2013). Ainda, em mioblastos C2C12, foi observado que vários miRNAs foram alterados após 4 e 8 dias de diferenciação (avaliação feita em *array* de miRNAs), incluindo redução de miR-345, que foi correlacionada negativamente com o

conteúdo de ATP intracelular (SIENGDEE et al., 2015); contudo, novamente a validação dessa redução não foi realizada, descreditando a interpretação desses estudos. Já o miR-874, que aumentou apenas no rato diabético hiperinsulinizado, já foi descrito alterado no processo de necrose de cardiomiócitos (WANG et al., 2013), e em pâncreas de ratos diabéticos por estreptozotocina (ZHANG et al., 2014), o que não apresenta consonância com o presente resultado.

Outros miRNAs alterados pelo diabetes e/ou tratamento com insulina no músculo esquelético foram o miR-29b e miR-29c. Aumento na expressão do miR-29a/b/c no diabetes já foi relatado em diversos tecidos, como fígado (LIANG et al., 2013; PANDY et al., 2011), células  $\beta$  (BAGGE et al., 2012; ROGGLI et al., 2012), músculo (GUEDES et al., 2015; HE et al., 2007; ZHOU et al., 2016b) e tecido adiposo (HE et al., 2007).

Recentemente, foi observada uma relação inversa entre a expressão do miR-29c e do GLUT4 em músculo cardíaco de animais obesos, sugerindo uma relação causal, embora esta hipótese necessite ser validada (GUEDES et al., 2015). Por outro lado, aumento na expressão do miR-29a foi observado em músculo esquelético de ratos que tiveram restrição de crescimento intrauterino (um modelo proposto de resistência à insulina), e, a super-expressão do miR-29a em células musculares C2C12, induziu uma redução de Slc2a4/GLUT4 (ZHOU et al., 2016b), contudo, no presente estudo, em músculo de ratos diabéticos, miR-29a mostrou-se inalterado. Ainda, assim como observado para o miR-29c (GUEDES et al., 2015), o efeito direto de miR-29a sobre a expressão de GLUT4 também precisa ser demonstrado. Além disso, em fígado de camundongos diabéticos (modelo db/db), foi observado aumento na expressão do miR-29a, e demonstrado que a subunidade p85α da PI3K (PIK3R1) é diretamente regulada pelo miR-29a, levando a redução na fosforilação de AKT (PANDEY et al, 2011). No mesmo estudo a super-expressão do miR-29a foi associada à aumentos na expressão do mRNA e da proteína PCK1 (do inglês phosphoenolpyruvate carboxykinase 1), enzima chave da gliconeogênese hepática (PANDEY et al., 2011). Recentemente, demonstrou-se que a super-expressão do miR-29b em hepatócitos primários de camundongos foi associada à reduções no mRNA e na proteína PIK3R1, além dos genes Ppargc1a (do inglês peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha), Pck1 e G6pc (do inglês glucose-6-phosphatase catalytic subunit) (LIU et al., 2015). Ainda, miR-29b inibiu a fosforilação de AKT e a expressão da PIK3R1 estimulada por AICAR (ativador de AMPK) (LIU et al., 2015). Apesar de não demonstrada que PIK3R1 é diretamente inibida pelo miR-29b, os autores sugerem tal regulação, uma vez que todos os membros da família do miR-29 (a/b/c) possuem a mesma sequência semente, que é considerada a sequência crítica no reconhecimento do alvo.

Ainda, o conhecimento a respeito do papel do miR-29 foi ampliado com o elegante estudo conduzido por Liang et al., (2013), que observou não só o aumento do miR-29a no fígado de camundongos diabéticos (como visto por PANDEY et al., 2011), mas de toda a família deste miRNA, incluindo miR-29b e miR-29c. Entretanto, ao contrário do esperado, quando estes animais foram tratados com adenovírus para super-expressarem cronicamente miR-29a/b/c (injeção intravenosa, diferentes dias), observou-se aumento da tolerância à glicose e reduções na glicemia de jejum, na produção hepática de glicose e nos genes gliconeogênicos, G6pc e Pck1 (LIANG et al., 2013). Assim, os efeitos na redução da produção hepática de glicose e na glicemia de jejum foram comprovados por meio da regulação direta de Ppargc1a e G6pc pelos miR-29a/b/c (LIANG et al., 2013). Desse modo, mais estudos precisam ser realizados para clarificar o papel do miR-29a/b/c no tecido hepático.

Considerando que a ativação de PI3K/AKT desempenha papel importante na indução da expressão de *Slc2a4*/GLUT4 (MORAES et al., 2014), pode-se conjecturar que o miR-29b e o miR-29c, além de inibirem diretamente os alvos *Slc2a4*/GLUT4, podem inibir também indiretamente via redução da atividade PI3K/AKT. Nesse sentido, destaca-se o estudo pioneiro realizado por He et al. (2007), onde foi descrito um aumento na expressão do miR-29a/b/c em músculo, tecido adiposo e fígado de ratos diabéticos (Goto-Kakizaki), e a sua superexpressão em adipócitos 3T3-L1 induziu prejuízo na captação de glicose estimulado por insulina, bem como redução na fosforilação de AKT sem alterar o seu conteúdo. Esse resultado foi reforçado, quando novamente, apenas a fosforilação e não o conteúdo da AKT foi aumentada por meio da inibição do miR-29a/b/c; o que levou os autores sugerirem outros alvos de miR-29a/b/c. Assim, considerando que a ativação de AKT é dependente de PIK3R1 e que esta proteína é regulada diretamente pelo miR-29a/b/c (PANDEY et al., 2011), se esclarece o estudo de He et al. (2007).

MiR-93 e miR-199a apresentaram-se reduzidos em músculo esquelético de ratos diabéticos. Um elegante estudo demonstrou que miR-93 apresentou-se super-expresso em tecido adiposo subcutâneo abdominal de mulheres resistentes à insulina com e sem síndrome do ovário policístico, e, a expressão de miR-93 correlacionou-se negativamente com os níveis de GLUT4 e positivamente com o índice HOMA-IR (CHEN et al., 2013). Além disso, o estudo de Chen et al. (2013) mostrou que adipócitos 3T3-L1 transfectados com miR-93

apresentavam diminuição na expressão de *Slc2a4*/GLUT4. Esses resultados são opostos ao observado no presente estudo em que o miR-93 reduziu em paralelo à redução do *Slc2a4* em músculo esquelético de animais diabéticos. É possível que as diferenças entre os tecidos (músculo versus adiposo) e/ou o tipo de alteração metabólica (resistência à insulina versus diabetes insulinopênico) justifiquem a regulação inversa.

Em relação ao miR-199 (reduziu no músculo do rato com DM), já foi descrito aumento deste miRNA em plasma de portadores de DM2, e foi sugerido que este miRNA reduziria a expressão do GLUT4 (YAN et al., 2014). Quanto à alteração de nível plasmático de um miRNA, é muito difícil interpretar funcionalmente esse efeito, uma vez que não é clara a origem (territorial) do miRNA, e menos ainda o potencial funcional dessas moléculas circulantes. Por outro lado, a proposta de que o miR-199a inibe a expressão de GLUT4 esbarra em inúmeras obscuridades e ininteligibilidades do manuscrito (Yan et al., 2014). Por exemplo:

a) é interessante o dado de que em células HEK293T (de rim) co-transfectadas com a sequência completa (1.419 bp) da região 3'UTR do mRNA GLUT4 e com o gene luciferase, a transfecção adicional com miR-199a reduz a atividade luciferase, indicando ação direta do miR-199a no mRNA *Slc2a4*; entretanto, é incompreensível a redução na expressão da proteína GLUT4 descrita, considerando que essa célula não expressa GLUT4, e que obviamente a região 3'UTR-*Slc2a4* sozinha não seria capaz de induzir a tradução da proteína. Adicione-se ainda o alerta de que essa célula não tem a mesma maquinaria transcricional relacionada ao gene *Slc2a4* encontrada na célula muscular;

b) é interessante a proposta de analisar células L6 (musculares) co-transfectadas com miR-199a e o mRNA *Slc2a4* contendo ou não a 3'UTR, entretanto o resultado associado a essa proposta, tanto no texto como na referida figura, é totalmente incompreensível, parecendo tratar-se apenas da superexpressão de GLUT4;

c) detalhes metodológicos que pudessem esclarecer essas dúvidas são totalmente omitidos, incluindo-se a falta de número de experimentos que parecem ser únicos.

Em suma, esse estudo (Yan et al., 2014) pouco contribui à construção de um conhecimento sólido quanto a regulação do miR-199a sobre o GLUT4 em células que naturalmente expressam esse transportador. Por isso, consideramos a presente observação de redução do miR-199a no músculo do rato diabético como um resultado muito mais significativo.

O controle da expressão miR-199a tem sido considerado atualmente como uma importante estratégia terapêutica para diminuição da glicólise no câncer hepático. Sabe-se que células tumorais apresentam uma reprogramação do metabolismo da glicose, com aumento da expressão e atividade de HK2, levando a uma aumentada captação de glicose e metabolismo glicolítico acelerado, o que favorece a proliferação do tumor (MATHUPALA; KO; PEDERSEN, 2009; VANDER HEIDEN, 2011). No carcinoma hepatocelular a redução na expressão de miR-199a é característica presente e, foi demonstrado que o mRNA *Hk2* sofre regulação direta do miR-199a. Estratégias que levam ao aumento da expressão deste miRNA parecem promover redução na captação de glicose e no crescimento e malignidade do tumor, além de aumento de sobrevida (GUO et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

Dois miRNAs miR-377 e miR-186 mostraram-se elevados apenas nos músculos dos animais diabéticos tratados com insulina comparados aos tratados com placebo. MiR-377 já foi descrito como supra-regulado no tecido renal, relacionando-se com nefropatia diabética (SAAL; HARVEY, 2009; WANG et al., 2008), e no miocárdio, relacionando-se com insuficiência cardíaca (JOLADARASHI et al., 2015). Além disso, alterações do miR-377 estão implicadas em uma variedade de tipos de câncer, incluindo câncer de pâncreas (CHANG et al., 2016), de pulmão (MENG et al., 2015), dentre outros. Já o miR-186 também foi envolvido em diversos tipos de tumores, incluindo câncer de próstata (HUA et al., 2016), carcinoma hepatocelular (RUAN et al., 2016), câncer de estômago (LIU et al., 2016), entre outros. Em relação ao câncer de estômago, miR-186 indicado como regulando indiretamente a HK2, contribuindo para a supressão do metabolismo glicolítico e proliferação do tumor (LIU et al., 2016). Além disso, miR-186 foi relacionado à inibição da diferenciação muscular, por diretamente regular o fator miogênico miogenina (ANTONIOU et al., 2014).

Outros miRNAs modulados pelo diabetes no presente estudo foram: miR-532-3p e miR-150. Estes foram preditos por 3 algoritmos como reguladores do *Slc2a4* e também foram preditos regularem os mRNAs *Hk2* e *Gys1*. O diabetes reduziu de maneira significante os níveis do miR-532-3p (26%) e o tratamento com insulina reverteu esse efeito. Reduções na expressão do miR-532-3p tem sido associadas a vias inflamatórias e apoptóticas em tecido renal de pacientes com doença renal crônica (RUDINICKI et al., 2016), e em câncer de mama (REVATHIDEVI et al 2016) e de bexiga (POSPISILOVA et al., 2016), dentre outros. No entanto, alterações do miR-532-3p no diabetes e/ou em músculo esquelético nunca foram descritas.

Em relação ao miR-150, que também reduziu no diabetes, diversos estudos já relacionaram alterações deste miRNA com o diabetes. De maneira semelhante ao observado no presente estudo, miR-150 apresentou-se reduzido em células mononucleares de sangue periférico de pacientes DM1 (ESTRELA et al., 2016), e, em músculo cardíaco de camundongos diabéticos por estreptozotocina tratados ou não com insulina (COSTANTINO et al., 2016). Além disso, as alterações na expressão deste miRNA foram relacionadas as vias de fibrose e hipertrofia do miocárdio induzidas pelo diabetes (COSTANTINO et al., 2016). Por outro lado, aumento na expressão do miR-150 também foi descrito em plasma de humanos portadores de DM2 (WANG et al., 2014; KAROLINA et al., 2011) e de mulheres obesas gestantes, nas quais se correlacionou com alterações metabólicas (CARRERAS-BADOSA et al., 2015). Entretanto, mais uma vez reiteramos que o potencial funcional desses miRNAs circulantes em diferentes territórios ainda é amplamente desconhecido. Ainda, miR-150 foi descrito aumentado em ilhotas pancreáticas de ratos diabéticos GK (ZENG et al., 2015) e em ilhotas cultivadas em alta concentração (20 mM) de glicose (KAROLINA et al., 2011). Finalmente, aumento de miR-150 (avaliado por meio de array de miRNAs) detectado em sangue periférico de humanos e em ilhotas cultivadas em alta concentração de glicose foi relacionado com redução de expressão de GLUT4, sem a menor consideração ao fato de que esses territórios não expressam GLUT4 (KAROLINA et al., 2011). Finalmente, aumento de miR-150 foi detectado (por meio de array) em músculo de ratos GK (DM2); porém, nenhuma consideração foi feita a esse achado (HE et al., 2007).

Adicionalmente, no presente estudo realizamos a análise de correlação entre os miRNAs alterados pelo diabetes com os níveis proteicos de GLUT4, HK2 e GYS1, e ainda com as variáveis metabólicas estudadas, buscando indicar uma relação causal entre essas variáveis. Nesse sentido, vale a pena destacar que a determinação da relação causal entre os miRNAs alterados com os níveis proteicos de GLUT4, HK2 e GYS1 estão além dos objetivos deste estudo; entretanto, a predição de alvo pela análise *in silico*, combinada com a análise de correlação, têm sido consideradas forte indício de relação causa-efeito entre as alterações de expressão de miRNA e de gene alvo.

De maneira importante, os miRNAs da família do miR-29 (29b e 29c) correlacionaram-se negativamente com a expressão de GLUT4, HK2 e GYS1, ou seja, à medida que há aumento na expressão desses miRNAs, parece haver uma redução concomitante na expressão dessas proteínas, sugerindo uma relação causal nas condições experimentais avaliadas. Redução no conteúdo de mRNA do *Slc2a4* é um dado bastante

conhecido em músculo de portadores de DM, o qual até agora tem sido atribuído a uma repressão na transcrição do gene *Slc2a4* (CORRÊA-GIANNELLA; MACHADO, 2013). Entretanto, o presente resultado agrega um possível efeito adicional do miR-29b/c, desestabilizando o mRNA *Slc2a4*, aumentando sua degradação e consequentemente reduzindo seu conteúdo. Além disso, é importante ressaltar que a redução em 55% do mRNA *Slc2a4* ampliou-se para 77% na proteína GLUT4, indicando um efeito adicional do miR-29b/c, reduzindo a eficiência de tradução do GLUT4 no DM. Conforme já comentado, um efeito do miR29a reduzindo mRNA *Slc2a4* e proteína GLUT4 já foi proposto em célula muscular (ZHOU et al., 2016b), embora ainda não tenha sido confirmado, e destacando que o miR-29a não se mostrou alterado pelo DM no presente estudo. Em suma, até o presente, nenhum estudo buscou relacionar miR-29a/b/c e GLUT4 no DM. Adicionalmente, as alterações dos miR-29b e miR-29c também correlacionaram negativamente com as alterações das enzimas HK2 e GYS1. Também, até o momento, os mRNAs *Hk2* e *Gys* nunca foram apontados como alvos dos miRNAs 29a/b/c, e uma possível relação causal permanece a ser determinada.

É importante destacar que as correlações com miR-29b/c foram detectadas em um conjunto de amostras de músculos provenientes de animais não diabéticos e diabéticos tratados com placebo ou insulina, compondo um espectro animais com variável controle glicêmico. Interessantemente, glicemia e glicosúria de 24 h correlacionaram positivamente com miR-29b/c, sugerindo que a expressão de miR-29b/c seja modulada pela concentração de glicose. Ainda nesse contexto, as análises de correlação sugerem que o efeito da concentração de glicose seja relativamente rápido, uma vez que a significância da correlação com a glicosúria de 24 h já foi menor (marginal para o miR-29c), e com a frutosamina foi perdida.

Por outro lado, GLUT4 e HK2 correlacionaram-se positivamente com miR-199a e miR-532-3p, indicando uma possível regulação indireta sobre *Slc2a4*/GLUT4 e *Hk2*/HK2 por meio destes miRNAs. Ainda, é importante ressaltar que ambos os miR-199a e miR-532-3p apresentaram uma correlação negativa altamente significativa com glicemia, glicosúria de 24 h e frutosamina, o que é um forte indício de que a expressão desses miRNAs seja modulada pela concentração de glicose. Nada em relação a esses miRNAs e GLUT4/HK2 em músculo esquelético de portadores de DM foi investigado até o momento.

Considerando a possibilidade de regulação indireta sobre *Slc2a4*/GLUT4 através dos miRNAs diminuídos no diabetes, especialmente daqueles correlacionados positivamente com GLUT4 (isto é, aqueles que reduziram no DM), investigamos a expressão de *Nfkb1*/NFKB1 e

*Rela*/RELA, dois fatores transcricionais membros da família de NFKB, que já foram demonstrados ter efeito inibitório sobre a expressão de *Slc2a4* (FURUYA et al., 2013). Constatamos que o conteúdo proteico do NFKB1, mas não o do mRNA *Nfkb1*, mostrou-se significativamente aumentado no DM. Dado ao fato de que miR-93 e miR-199a têm como alvo o NFKB1 e que estes estão diminuídos no DM, sugere-se uma menor inibição desses miRNAs sobre o mRNA *Nfkb1* aumentando seu efeito na tradução desta proteína. Embora não tenhamos observado aumento de RELA no DM, o qual em geral age como heterodímero junto com o NFKB1 sobre o *Slc2a4*, é importante destacar que: 1) essa análise foi feita no conteúdo citosólico da proteína (não no nuclear), e 2) o NFKB1 pode também agir como homodímero (FURUYA et al., 2013). Assim é bastante possível que esses 2 miRNAs estejam, de maneira indireta (pela via do NFKB), reduzindo a transcrição do gene *Slc2a4*.

Finalmente, não podemos excluir a possibilidade de que vários miRNAs, que se mostraram reduzidos em músculo de animais diabéticos, tenham uma participação indireta na expressão do GLUT4, via fatores transcricionais de efeito inibitório sobre *Slc2a4*/GLUT4. Esses fatores transcricionais incluem *Nfib*, *Ebf1*, *Ppara* e *Pparg* (ver tabela 7). Desse modo, abre-se um vasto campo de investigação e adiciona-se uma complexidade ainda maior no entendimento da regulação de *Slc2a4*/GLUT4 por miRNAs.

## 7 CONCLUSÃO

Conforme esperado, o diabetes reduziu a expressão de *Slc2a4*/GLUT4, *Hk2*/HK2 e *Gys1*/GYS1 no músculo sóleo.

Por meio de análise *in silico*, detectou-se centenas de miRNAs que têm o mRNA *Slc2a4* como alvo, muitos deles também com o mRNA *Hk2* como alvo, dos quais 20 foram avaliados. No músculo sóleo de ratos diabéticos, a expressão de miR-1, miR-29b e miR29c aumentou, enquanto a de miR-93, miR-199a, miR-345-3p, miR-532-3p e miR-150 reduziu. Além disso, miR-29b e miR-29c correlacionaram-se negativamente com GLUT4 e HK2, e positivamente com glicemia, glicosúria de 24 h e frutosamina, sugerindo uma regulação direta sobre esses mRNAs alvos, induzida pela concentração de glicose. Ainda, miR-199a e miR-532-3p correlacionaram-se positivamente com a expressão de GLUT4 e HK2, e também com as variáveis metabólicas, sugerindo uma regulação indireta sobre os mRNAs dessas proteínas; nesse sentido, demonstrou-se por análise *in silico* que o miR-199a tem como alvo o NFKB1, um repressor do gene *Slc2a4*, o qual diminuiu no DM, explicando, pelo menos parcialmente, o efeito indireto sobre o GLUT4.

Em suma, o presente estudo evidenciou, em músculo sóleo, que o diabetes aumenta a expressão de miR-29b e miR-29c, e reduz a expressão de miR-199a e miR-532-3p; o primeiro efeito, potencialmente age diretamente sobre a regulação do conteúdo de *Slc2a4*/GLUT4 e *Hk2*/HK2, e o segundo, potencialmente age indiretamente, via NFKB, na transcrição dos genes. Como consequência, as proteínas GLUT4 e HK2 diminuem, o que reduziria a utilização de glicose pelo músculo, contribuindo para a hiperglicemia do DM.

## **REFERÊNCIAS**\*

ADA. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 34, p. S62-S69, 2011. Suplemento 1.

ADA. American Diabetes Association. Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2012. **Diabetes Care**, v. 36, n. 4, p. 1033–1046, 2013.

AGARWAL, P. et al. MiR-135a targets IRS2 and regulates insulin signaling and glucose uptake in the diabetic gastrocnemius skeletal muscle. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1832, n. 8, p. 1294–1303, 2013.

ALBERS, P. H. et al. Human muscle fiber type-specific insulin signaling: Impact of obesity and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 64, n. 2, p. 485–497, 2015.

ALVES-WAGNER, A. B. et al. Decreased diabetes-induced glycemic impairment in WKY and SHR involves enhanced skeletal muscle Slc2a4/GLUT4 expression. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 6, n. 1, p. 97, 2014.

ANTONIOU, A. et al. MiR-186 inhibits muscle cell differentiation through myogenin regulation. Journal of Biological Chemistry, v. 289, n. 7, p. 3923–3935, 2014.

BACHA, F.; KLINEPETER BARTZ, S. Insulin resistance, role of metformin and other noninsulin therapies in pediatric type 1 diabetes. **Pediatric Diabetes**, p. 1–14, 2015.

BAGGE, A. et al. MicroRNA-29a is up-regulated in beta-cells by glucose and decreases glucose-stimulated insulin secretion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 426, n. 2, p. 266–272, 2012.

BAKER, J. R. et al. Use of protein-based standards in automated colorimetric determinations of fructosamine in serum. **Clinical Chemistry**, v. 31, n. 9, p. 1550–1554, 1985.

BALAMURUGAN, A. et al. Streptozotocin (STZ) is commonly used to induce diabetes in animal models. **Pancreas**, v. 26, n. 1, p. 102–103, 2003.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. Cell, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215–33, 2009.

BASHA, R. H.; SANKARANARAYANAN, C.  $\beta$ -Caryophyllene, a natural sesquiterpene, modulates carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. Acta Histochemica, v. 116, n. 8, p. 1469–79, 2014.

CAMPELLO, R. S. et al. Estrogen receptor 1 agonist PPT stimulates Slc2a4 gene expression and improves insulin-induced glucose uptake in adipocytes. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 19, p. 2059–69, 2012.

CAMPS, M. et al. Effect of diabetes and fasting on GLUT-4 (muscle/fat) glucose-transporter expression in insulin-sensitive tissues. **Biochemical Journal**, v. 282, p. 765–772, 1992.

<sup>\*</sup>De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CARRERAS-BADOSA, G. et al. Altered circulating miRNA expression profile in pregestational and gestational obesity. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 100, n. 11, p. E1446–E1456, 2015.

CHANDRAMOHAN, R. et al. Tyrosol, a phenolic compound, ameliorates hyperglycemia by regulating key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 229, p. 44–54, 2015.

CHANG, W. et al. MiR-377 inhibits the proliferation of pancreatic cancer by targeting Pim-3. **Tumor Biology**, p. Epub ahead of print, 2016.

CHAVALI, V.; TYAGI, S. C.; MISHRA, P. K. Differential Expression of Dicer, miRNAs, and Inflammatory Markers in Diabetic Ins2+/- Akita Hearts. Cell Biochemistry and Biophysics, v. 68, n. 1, p. 25–35, 2014.

CHEN, Q. et al. MiR-345 suppresses proliferation, migration and invasion by targeting Smad1 in human prostate cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 142, n. 1, p. 213–224, 2015.

CHEN, Y. H. et al. miRNA-93 inhibits GLUT4 and is overexpressed in adipose tissue of polycystic ovary syndrome patients and women with insulin resistance. **Diabetes**, v. 62, n. 7, p. 2278–2286, 2013.

CHUANG, T.-Y. et al. MicroRNA-223 Expression Is Upregulated in Insulin Resistant Human Adipose Tissue. Journal of Diabetes Research, v. 2015, p. 1–8, 2015.

CORRÊA-GIANNELLA, M. L.; MACHADO, U. F. SLC2A4gene: a promising target for pharmacogenomics of insulin resistance. **Pharmacogenomics**, v. 14, n. 8, p. 847–50, 2013.

COSTANTINO, S. et al. MicroRNA profiling unveils hyperglycaemic memory in the diabetic heart. **European Heart Journal**, v. 37, n. 6, p. 572–576, 2015.

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, 2000.

DAVIS-DUSENBERY, B. N.; HATA, A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. Journal of Biochemistry, v. 148, n. 4, p. 381–392, 2010.

DEEB, S. S.; MALKKI, M.; LAAKSO, M. Human hexokinase II: sequence and homology to other hexokinases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 197, n. 1, p. 68–74, 1993.

DEFRONZO, R. A. et al. The Effect of Insulin on the Disposal of Intravenous Glucose. Results from Indirect Calorimetry and Hepatic and Femoral Venous Catheterization. **Diabetes**, v. 30, n. 12, p. 1000–1007, 1981.

DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Medical Clinics of North America, v. 88, n. 4, p. 787–835, jul. 2004.

DMITRIEV, P. et al. Defective regulation of MicroRNA target genes in myoblasts from facioscapulohumeral dystrophy patients. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 49, p. 34989–35002, 2013.

DOHM, G. et al. Decreased expression of glucose transporter in muscle from insulin-resistant patients. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 260, n. 3 Pt 1, p. E459–E463, 1991.

DWEEP, H. et al. miRWalk – Database : Prediction of possible miRNA binding sites by "' walking "' the genes of three genomes. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 44, n. 5, p. 839–847, 2011.

ELDAR-FINKELMAN, H. Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 3, p. 126–132, 2002.

EL-SHAZLY, A. S. et al. Synthesis, characterization, and efficacy evaluation of a new antidiabetic vanadyl(II) thiamine hydrochloride complex in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 28, n. 2, p. 227–239, 2015.

ESTRELLA, S. et al. Expression of miR-22 and miR-150 in type 1 diabetes mellitus: Possible relationship with autoimmunity and clinical characteristics. **Medicina Clínica**, v. 147, n. 6, p. 245–247, 2016.

FERNÁNDEZ-HERNANDO, C. et al. MicroRNAs in metabolic disease. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, v. 33, n. 2, p. 178–185, 2013.

FOLEY, K.; BOGUSLAVSKY, S.; KLIP, A. Endocytosis, recycling, and regulated exocytosis of glucose transporter 4. **Biochemistry**, v. 50, n. 15, p. 3048–3061, 2011.

FREITAS, H. S. et al. SLC2A2 gene expression in kidney of diabetic rats is regulated by HNF-1 $\alpha$  and HNF-3 $\beta$ . **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 305, n. 1–2, p. 63–70, 2009.

FRIAS, F. DE T. et al. MyomiRs as Markers of Insulin Resistance and Decreased Myogenesis in Skeletal Muscle of Diet-Induced Obese Mice. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, p. 1–12, 2016.

FRIEDMAN, R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Research, v. 19, n. 1, p. 92–105, 2009.

FURUYA, D. T. et al. Identification of nuclear factor-kappaB sites in the Slc2a4 gene promoter. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 370, n. 1–2, p. 87–95, 2013.

GALLAGHER, I. J. et al. Integration of microRNA changes in vivo identifies novel molecular features of muscle insulin resistance in type 2 diabetes. **Genome Medicine**, v. 2, n. 9, p. 1–18, 2010.

GARFIN, D. E. One-Dimensional Gel Electrophoresis. **Methods in Enzymology**, v. 182, p. 425–441, 1990.

GARVEY, W. T. et al. Gene expression of GLUT4 in skeletal muscle from insulin-resistant patients with obesity, IGT, GDM, and NIDDM. **Diabetes**, v. 41, p. 465–75, 1992.

GASTER, M. et al. GLUT4 Is Reduced in Slow Muscle Fibers of Type 2 Diabetic Patients. Is Insulin Resistance in Type 2 Diabetes a Slow, Type 1 Fiber Disease? **Diabetes**, v. 50, n. 6, p. 1324–1329, 2001.

GIM, J.-A. et al. Transcriptional expression changes of glucose metabolism genes after exercise in thoroughbred horses. **Gene**, v. 547, n. 1, p. 152–158, 2014.

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. **Diabetes**, v. 58, p. 2555–2564, 2009.

GRAPHPAD. Version 5.0. La Jolla, USA. Software.

GREENBERG, C. C. et al. Glycogen branches out: new perspectives on the role of glycogen metabolism in the integration of metabolic pathways. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 291, n. 1, p. E1-8, 2006.

GROOP, L. C. et al. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. Journal of Clinical Investigation, v. 84, n. 1, p. 205–213, 1989.

GUARIGUATA, L. et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 103, n. 2, p. 137–149, 2014.

GUAY, C. et al. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? **Translational Research**, v. 157, n. 4, p. 253–264, 2011.

GUAY, C.; REGAZZI, R. Role of islet microRNAs in diabetes: which model for which question? **Diabetologia**, v. 58, n. 3, p. 456–463, 2015.

GUEDES, E. C. et al. MicroRNA Expression Signature Is Altered in the Cardiac Remodeling Induced by High Fat Diets. Journal of Cellular Physiology, v. 231, n. 8, p. 1771–83, 2015.

GULLER, I.; RUSSELL, A. P. MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function. **Journal of Physiology**, v. 588, n. Pt 21, p. 4075–4087, 2010.

GUO, H. et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. **Nature**, v. 466, p. 835–40, 12 ago. 2010.

GUO, W. et al. MiR-199a-5p is negatively associated with malignancies and regulates glycolysis and lactate production by targeting hexokinase 2 in liver cancer. **Hepatology**, v. 62, n. 4, p. 1132–1144, 2015.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, v. 15, n. 8, p. 509–524, 2014.

HANDBERG, A. et al. Expression of insulin regulatable glucose transporters in skeletal muscle from Type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. **Diabetologia**, v. 33, n. 10, p. 625–627, 1990.

HARDIN, D. S.; DOMINGUEZ, J. H.; GARVEY, W. T. Muscle Group-Specific Regulation of GLUT 4 Glucose Transporters in Control, Diabetic, and Insulin-Treated Diabetes Rats. **Metabolism**, v. 42, n. 10, p. 1310–1315, 1993.

HE, A. et al. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. **Molecular endocrinology**, v. 21, n. 11, p. 2785–94, nov. 2007.

HENRIKSEN, E. J. et al. Glucose transporter protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscles. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, v. 259, p. E593-8, 1990.

HERMAN, M. A.; KAHN, B. B. Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. **The Journal Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1767–1775, 2006.

HERRERA, B. M. et al. Global microRNA expression profiles in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 53, n. 6, p. 1099–1109, 2010.

HILDEBRANDT, A. L.; PILEGAARD, H.; NEUFER, P. D. Differential transcriptional activation of select metabolic genes in response to variations in exercise intensity and duration. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 285, n. 5, p. E1021-7, 2003.

HORIE, T. et al. MicroRNA-133 regulates the expression of GLUT4 by targeting KLF15 and is involved in metabolic control in cardiac myocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 389, n. 2, p. 315–320, 2009.

HUA, X. et al. miR-186 inhibits cell proliferation of prostate cancer by targeting GOLPH3. **American Journal of Cancer Research**, v. 6, n. 8, p. 1650–1660, 2016.

HUANG, B. et al. MicroRNA expression profiling in diabetic GK rat model. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, v. 41, n. 6, p. 472–477, 2009.

HUANG, S.; CZECH, M. P. The GLUT4 Glucose Transporter. Cell Metabolism, v. 5, n. 4, p. 237–252, 2007.

HUSSAIN, M. U. MicroRNAs (miRNAs): Genomic organisation, biogenesis and mode of action. Cell and Tissue Research, v. 349, n. 2, p. 405–413, 2012.

IM, S.-S. et al. Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. **IUBMB life**, v. 59, n. 3, p. 134–145, 2007.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas, 2015.

JENSEN, T. E. et al. EMG-Normalised kinase activation during exercise is higher in human gastrocnemius compared to soleus muscle. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31054, 2012.

JESSEN, N.; GOODYEAR, L. J. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. Journal of Applied Physiology, v. 99, n. 1, p. 330–337, 2005.

JIANG, L. Q. et al. Autocrine role of interleukin-13 on skeletal muscle glucose metabolism in type 2 diabetic patients involves microRNA let-7. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, v. 305, n. 11, p. E1359-66, 2013.

JIANG, Q. et al. miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D98–D104, 2009.

JIANG, S. et al. A novel miR-155/miR-143 cascade controls glycolysis by regulating hexokinase 2 in breast cancer cells. **EMBO Journal**, v. 31, n. 8, p. 1985–98, 2012.

JOHN, B. et al. Human MicroRNA Targets. PLoS Biology, v. 2, n. 11, p. e363, 2004.

JOLADARASHI, D. et al. Enhanced cardiac regenerative ability of stem cells after ischemiareperfusion injury: Role of human CD34+ cells deficient in microRNA-377. Journal of the American College of Cardiology, v. 66, n. 20, p. 2214–2226, 2015.

JONES, J. P. et al. Transcriptional Regulation of Hexokinase II in Denervated Rat Skeletal Muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 238, n. 1, p. 53–55, 1997.

JONES, J. P.; DOHM, G. L. Regulation of glucose transporter GLUT-4 and hexokinase II gene transcription by insulin and epinephrine. **American Journal of Physiology**, v. 273, n. (4 Pt 1), p. E682–E687, 1997.

KAINULAINEN, H. et al. Dissiociation of the effect of training on oxidative metabolism, glucose utilization and GLUT 4 levels in skeletal muscle of streptozotocin-diabetic rats. **Pflugers Archiv**, v. 427, n. 5–6, p. 444–449, 1994.

KANTHARIDIS, P. et al. Diabetes complications: The microRNA perspective. **Diabetes**, v. 60, n. 7, p. 1832–1837, 2011.

KARNIELI, E.; ARMONI, M. Transcriptional regulation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 gene: from physiology to pathology. **American Journal of Physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 295, n. 1, p. E38-45, 2008.

KAROLINA, D. S. et al. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e22839, 2011.

KATO, M.; CASTRO, N. E.; NATARAJAN, R. MicroRNAs: potential mediators and biomarkers of diabetic complications. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 64, p. 85–94, 2013.

KATZEN, H. M.; SCHIMKE, R. T. Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution, age dependency, and properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 54, n. 4, p. 1218–25, 1965.

KELLEY, D. E.; MOKAN, M.; MANDARINO, L. J. Intracellular defects in glucose metabolism in obese patients with NIDDM. **Diabetes**, v. 41, n. 6, p. 698–706, 1992.

KERN, M. et al. Insulin responsiveness in skeletal muscle is determined by glucose transporter (Glut4) protein level. **Biochemical Journal**, v. 270, n. 2, p. 397–400, 1990.

KERTESZ, M. et al. The role of site accessibility in microRNA target recognition. **Nature Genetics**, v. 39, n. 10, p. 1278–1284, 2007.

KIM, H. K. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. Journal of Cell Biology, v. 174, n. 5, p. 677–687, 2006.

KIM, J. K. et al. Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of GLUT4. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 1, p. 153–60, 2001.

KIM, V. N.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 2, p. 126–139, 2009.

KIRBY, T. J.; MCCARTHY, J. J. MicroRNAs in skeletal muscle biology and exercise adaptation. Free Radical Biology and Medicine, v. 64, p. 95–105, 2013.

KIRIAKIDOU, M. et al. A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. **Genes and Development**, v. 18, n. 10, p. 1165–1178, 2004.

KLIP, A. The many ways to regulate glucose transporter 4. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, v. 34, n. 3, p. 481–487, 2009.

KREK, A. et al. Combinatorial microRNA target predictions. **Nature Genetics**, v. 37, n. 5, p. 495–500, 2005.

KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILIPOWICZ, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nature Reviews. Genetics**, v. 11, n. 9, p. 597–610, 2010.

LAGOS-QUINTANA, M. et al. Identification of tissue-specific MicroRNAs from mouse. **Current Biology**, v. 12, n. 9, p. 735–739, 2002.

LAI, Y.-C. et al. Glycogen content and contraction regulate glycogen synthase phosphorylation and affinity for UDP-glucose in rat skeletal muscles. American Journal of **Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 6, p. E1622–E1629, 2007.

LATOUCHE, C. et al. MicroRNA-194 Modulates Glucose Metabolism and Its Skeletal Muscle Expression Is Reduced in Diabetes. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0155108, 2016.

LEE, D. E. et al. microRNA-16 Is Downregulated During Insulin Resistance and Controls Skeletal Muscle Protein Accretion. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, n. 8, p. 1775–1787, 2016.

LEE, E. J. et al. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. **RNA**, v. 14, n. 1, p. 35–42, 2008.

LEE, H. et al. MicroRNA-494, upregulated by tumor necrosis factor-a, desensitizes insulin effect in C2C12 muscle cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e83471, 2013.

LEE, J.; KIM, M. S. The role of GSK3 in glucose homeostasis and the development of insulin resistance. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 77, p. S49-57, 2007. Suplemento 1.

LEE, J.-E. Alternative biomarkers for assessing glycemic control in diabetes: fructosamine, glycated albumin, and 1,5-anhydroglucitol. **Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 2, p. 74–8, 2015.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The C . elegans Heterochronic Gene lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to lin-14. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, 1993.

LEHTO, M. et al. Human hexokinase II gene: exon-intron organization, mutation screening in NIDDM, and its relationship to muscle hexokinase activity. **Diabetologia**, v. 38, n. 12, p. 1466–1474, 1995.

LEITÃO, A. L.; COSTA, M. C.; ENGUITA, F. J. A Guide for miRNA Target Prediction and Analysis Using Web-Based Applications. **Methods in Molecular Biology**, v. 1182, p. 265–77, 2014.

LETURQUE, A. et al. Improvement of insulin action in diabetic transgenic mice selectively overexpressing GLUT4 in skeletal muscle. **Diabetes**, v. 45, n. 1, p. 23–7, 1996.

LEWIS, B. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, v. 120, n. 1, p. 15–20, 2005.

LI, L. Q. et al. MicroRNA-181b inhibits glycolysis in gastric cancer cells via targeting hexokinase 2 gene. **Cancer Biomarkers**, v. 17, n. 1, p. 75–81, 2016.

LIANG, J. et al. MicroRNA-29a-c decrease fasting blood glucose levels by negatively regulating hepatic gluconeogenesis. **Journal of Hepatology**, v. 58, n. 3, p. 535–542, 2013.

LIMA, G. A. et al. Contractile activity per se induces transcriptional activation of SLC2A4 gene in soleus muscle : involvement of MEF2D, HIF-1a, and TRalpha transcriptional factors. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 1, p. E132-8, 2009.

LIMA, G. A. O diabetes abole o aumento da expressão do gene do glut4 sob a atividade contrátil "in vitro" em músculo sóleo de ratos wistar. Participação das vias de sinalização da AMPK e CAMKII e dos fatores transcricionais MEF2D, GEF, HIF-1α e TRα. 2011. 87 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

LING, C.; GROOP, L. Epigenetics : A Molecular Link Between Environmental Factors and Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 58, p. 2718–2725, 2009.

LIU, J. et al. AICAR enhances insulin signaling via downregulation of miR-29. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, v. 93, n. August, p. 1–7, 2015.

LIU, L. et al. MiR-186 inhibited aerobic glycolysis in gastric cancer via HIF-1 $\alpha$  regulation. **Oncogenesis**, v. 5, n. 5, p. e224, 2016.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402– 408, 2001.

LORENZEN, J. et al. MicroRNAs in diabetes and diabetes-associated complications. **RNA Biology**, v. 9, n. 6, p. 820–827, 2012.

LU, H.; BUCHAN, R. J.; COOK, S. A. MicroRNA-223 regulates Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism. Cardiovascular Research, v. 86, n. 3, p. 410–420, 2010.

LY, X. et al. Inhibition of microRNA-155 sensitizes lung cancer cells to irradiation via suppression of HK2-modulated glucose metabolism. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 2, p. 1332–1338, 2016.

MACAULAY, K. et al. Constitutive activation of GSK3 down-regulates glycogen synthase abundance and glycogen deposition in rat skeletal muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 10, p. 9509–9518, 2005.

MACHADO, U. F.; SHIMIZU, Y.; SAITO, M. Decreased Glucose Transporter (GLUT4) Content in Insulin-Sensitive Tissues of Obsese Aurothioglucose- and Monosodium Glutamate-Treated Mice. **Hormone and Metabolic Research**, v. 25, n. 9, p. 462–465, 1993.

MACKRELL, J. G.; CARTEE, G. D. A novel method to measure glucose uptake and myosin heavy chain isoform expression of single fibers from rat skeletal muscle. **Diabetes**, v. 61, n. 5, p. 995–1003, 2012.

MANDARINO, L. J. et al. Regulation of hexokinase II and glycogen synthase mRNA, protein, and activity in human muscle. **American Journal of Physiology. Endocrinology** and **Metabolism**, v. 269, p. E701-8, 1995.

MATHUPALA, S. P.; KO, Y. H.; PEDERSEN, P. L. Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer's stygian link to the "Warburg effect" and a pivotal target for effective therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 19, n. 1, p. 17–24, 2009.

MCCARTHY, J. J. et al. Evidence of MyomiR network regulation of beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy. **Physiological Genomics**, v. 39, n. 3, p. 219–226, 2009.

MEIJER, H. A. et al. Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNAmediated gene regulation. **Science**, v. 340, n. 6128, p. 82–85, 2013.

MENG, F. et al. microRNA-377 inhibits non-small-cell lung cancer through targeting AEG-1. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 11, p. 13853–13863, 2015.

MERGER, S. R. et al. Prevalence and comorbidities of double diabetes. **Diabetes Research** and **Clinical Practice**, v. 119, p. 48–56, 2016.

MERGER, S. R.; LESLIE, R. D.; BOEHM, B. O. The broad clinical phenotype of Type 1 diabetes at presentation. **Diabetic Medicine**, v. 30, n. 2, p. 170–178, 2013.

MIN, H.; YOON, S. Got target?: computational methods for microRNA target prediction and their extension. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 42, n. 4, p. 233–244, 2010.

MIRANDA, K. C. et al. A Pattern-Based Method for the Identification of MicroRNA Binding Sites and Their Corresponding Heteroduplexes. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1203–1217, 2006.

MIRBASE. c2014. Disponível em: <a href="http://www.mirbase.org/">http://www.mirbase.org/</a>. Acesso em 10 de junho de 2015.

miR2Disease Base. [Internet]. Indianapolis: Indiana University: School of Medicine. Disponível em: <a href="http://www.mir2disease.org/">http://www.mir2disease.org/</a>>. Acesso em 31 de agosto de 2016.

MITSUMOTO, Y.; KLIP, A. Developmental Regulation of the Subcellular Distribution and Glycosylation of GLUTI and GLUT4 Glucose Transporters during Myogenesis of L6 Muscle Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 7, p. 4957–4962, 1992.

MORAES, P. A. et al. Insulin acutely triggers transcription of Slc2a4 gene: participation of the AT-rich, E-box and NFKB-binding sites. Life sciences, v. 114, n. 1, p. 36–44, 2014.

MUOIO, D. M.; NEWGARD, C. B. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. **Nature Reviews. Molecular cell biology**, v. 9, p. 193–205, mar. 2008.

MUTLU, M. et al. miR-564 acts as a dual inhibitor of PI3K and MAPK signaling networks and inhibits proliferation and invasion in breast cancer. **Scientific Reports**, v. 6, p. 32541, 2016.

NEUFERS, P. D.; CAREY, J.; DOHM, G. L. Transcriptional Regulation of the Gene for Glucose Transporter GLUT4 in Skeletal Muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 19, p. 13824–13829, 1993.

NIELSEN, S. et al. Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle.PDF. Journal of Physiology, v. 588, n. 20, p. 4029–4037, 2010.

O'DOHERTY, R. M. et al. Rat skeletal muscle hexokinase II mRNA and activity are increased by a single bout of acute exercise. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, v. 266, p. E-171-8, 1994.

O'DOHERTY, R. M. et al. Transcription of the rat skeletal muscle hexokinase II gene is increased by acute exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 81, n. 2, p. 789–93, 1996.

OKAMOTO, M. M. et al. Intensive insulin treatment induces insulin resistance in diabetic rats by impairing glucose metabolism-related mechanisms in muscle and liver. **Journal of Endocrinology**, v. 211, p. 55–64, out. 2011.

OKAMURA, K. et al. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila. **Cell**, v. 130, n. 1, p. 89–100, 2007.

OLENA, A. F.; PATTON, J. G. Genomic Organization of microRNAs Abigail. Journal of Cellular Physiology, v. 222, n. 3, p. 1–16, 2010.

OROM, U. A.; NIELSEN, F. C.; LUND, A. H. MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. **Molecular Cell**, v. 30, n. 4, p. 460–471, 2008.

OSAWA, H. et al. Regulation of hexokinase II gene transcription and glucose phosphorylation by catecholamines, cyclic AMP, and insulin. **Diabetes**, v. 44, n. 12, p. 1426–1432, 1995.

PANDEY, A. K. et al. MiR-29a levels are elevated in the db/db mice liver and its overexpression leads to attenuation of insulin action on PEPCK gene expression in HepG2 cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 332, n. 1–2, p. 125–133, 2011.

PANDY, H. C. et al. Serum fructosamine as an index of glycemia: comparison with glycated haemoglobin in diabetic and non-diabetic individuals. **Practical Diabetes**, v. 4, n. 3, p. 126–128, 1987.

PARK, S. Y. et al. Implications of microRNAs in the pathogenesis of diabetes. Archives of Pharmacal Research, v. 36, n. 2, p. 154–166, 2013.

PASQUINELLI, A. E. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature**, v. 408, n. 6808, p. 86–89, 2000.

PEDERSEN, O. J. et al. Evidence against altered expression of GLUT 1 or GLUT 4 in skeletal muscle of patients with obesity or NIDDM. **Diabetes**, v. 39, n. 7, p. 865–870, 1990.

PENDERGRASS, M. et al. Insulin-induced hexokinase II expression is reduced in obesity and NIDDM. **Diabetes**, v. 47, n. 3, p. 387–394, 1998.

POSPISILOVA, S. et al. MicroRNAs in urine supernatant as potential non-invasive markers for bladder cancer detection. **Neoplasma**, v. 63, n. 5, p. 799–808, 2016.

POSTIC, C. et al. The effects of hyperinsulinemia and hyperglycemia on GLUT4 and hexokinase II mRNA and protein in rat skeletal muscle and adipose tissue. **Diabetes**, v. 42, n. 6, p. 922–929, 1993.

POY, M. N.; SPRANGER, M.; STOFFEL, M. microRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Diabetes, Obesity & Metabolism**, v. 9, p. 67–73, nov. 2007. Suplemento 2.

PRINTZ, R. L. et al. Hexokinase I1 mRNA and Gene Structure, Regulation by Insulin, and Evolution. Journal of Biological Chemistry, v. 268, n. 7, p. 5209–5219, 1993.

QIN, Y. et al. MiR-4458 suppresses glycolysis and lactate production by directly targeting hexokinase2 in colon cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 469, n. 1, p. 37–43, 2016.

RAFFORT, J. et al. Circulating microRNAs and diabetes: potential applications in medical practice. **Diabetologia**, v. 58, p. 1978–1992, 2015.

REFFINDER. c2013. Disponível em:

<a href="http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference">http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference</a>. Acesso em: 10 de agosto de 2013

REVATHIDEVI, S. et al. Screening for the 3 ' UTR Polymorphism of the PXR Gene in South Indian Breast Cancer Patients and its Potential role in Pharmacogenomics. Asian Pacific Journal of Cancer Preventive, v. 17, n. 8, p. 3971–3977, 2016.

RICHARDSON, J. M. et al. Differential regulation of glucose transporter activity and expression in red and white skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 19, p. 12690–12694, 1991.

RICHTER, E. A.; HARGREAVES, M. Exercise, GLUT4, and Skeletal Muscle Glucose Uptake. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 3, p. 993–1017, 2013.

ROGGLI, E. et al. Changes in microRNA expression contribute to pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction in prediabetic NOD mice. **Diabetes**, v. 61, n. 7, p. 1742–1751, 2012.

RUAN, T. et al. MicroRNA-186 targets yes-associated protein 1 to inhibit hippo signaling and tumorigenesis in hepatocellular carcinoma. **Oncology Letters**, v. 11, n. 4, p. 2941–2945, 2016.

RUDNICKI, M. et al. Renal microRNA- and RNA-profiles in progressive chronic kidney disease. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 46, n. 3, p. 213–226, 2016.

RUSSELL, A. P. et al. Regulation of miRNAs in human skeletal muscle following acute endurance exercise and short-term endurance training. **Journal of Physiology**, v. 591, n. 18, p. 4637–53, 2013.

SAAL, S.; HARVEY, S. J. MicroRNAs and the kidney: coming of age. Current Opinion in Nephrology and Hypertension, v. 18, n. 4, p. 317–323, 2009.

SAVAGE, D. B.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. **Hypertension**, v. 45, n. 5, p. 828–33, maio 2005.

SCHAUER, I. E. et al. Insulin resistance, defective insulin-mediated fatty acid suppression, and coronary artery calcification in subjects with and without type 1 diabetes. The CACTI study. **Diabetes**, v. 60, n. 1, p. 306–314, 2011.

SEMPERE, L. F. et al. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. **Genome Biology**, v. 5, n. 3, p. R13, 2004.

SHANTIKUMAR, S.; CAPORALI, A.; EMANUELI, C. Role of microRNAs in diabetes and its cardiovascular complications. **Cardiovascular Research**, v. 93, n. 4, p. 583–593, 2012.

SHEPHERD, P. R.; KAHN, B. B. Glucose transporters and insulin action - Implications for insulin resistance and diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 4, p. 248–57, 1999.

SHI, Z. et al. Differential expression of microRNAs in omental adipose tissue from gestational diabetes mellitus subjects reveals miR-222 as a regulator of ER $\alpha$  expression in estrogen-induced insulin resistance. **Endocrinology**, v. 155, n. 5, p. 1982–1990, 2014.

SHIRDEL, E. A. et al. NAViGaTing the Micronome – Using Multiple MicroRNA Prediction Databases to Identify Signalling Pathway-Associated MicroRNAs. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17429, 2011.

SHULMAN, G. et al. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **New England Journal of Medicine**, v. 322, n. 4, p. 223–238, 1990.

SIENGDEE, P. et al. MicroRNAs Regulate Cellular ATP Levels by Targeting Mitochondrial Energy Metabolism Genes during C2C12 Myoblast Differentiation. **PloS One**, v. 10, n. 5, p. e0127850, 2015.

SILVA, J. L. T. et al. NF-kappaB, MEF2A, MEF2D and HIF1-a involvement on insulin- and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 240, n. 1–2, p. 82–93, 30 ago. 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014-2015, 2015.

SRIVASTAVA, S. K. et al. MicroRNA-345 induces apoptosis in pancreatic cancer cells through potentiation of caspase-dependent and -independent pathways. **British Journal of Cancer**, v. 113, n. 4, p. 660–668, 2015.

STOPPANI, J. et al. AMP-activated protein kinase activates transcription of the UCP3 and HKII genes in rat skeletal muscle. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, v. 283, n. 6, p. E1239–E1248, 2002.

STUART, C. A. et al. Slow-twitch fiber proportion in skeletal muscle correlates with insulin responsiveness. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 98, n. 5, p. 2027–2036, 2013.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v. 50, p. 537–46, jan. 2001.

TSAO, T. S. et al. Enhanced insulin action due to targeted GLUT4 overexpression exclusively in muscle. **Diabetes**, v. 45, n. 1, p. 28–36, 1996.

ULDRY, M.; THORENS, B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. **Pflugers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 447, n. 5, p. 480–489, 2004.

VAN ROOIJ, E. et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. **Developmental Cell**, v. 17, n. 5, p. 662–673, 2009.

VANDER HEIDEN, M. G. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 10, n. 9, p. 671–684, 2011.

VESTERGAARD, H. et al. Glycogen synthase and phosphofructokinase protein and mRNA levels in skeletal muscle from insulin-resistant patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 6, p. 2342–2350, 1993.

VESTERGAARD, H. et al. Impaired Activity and Gene Expression of Hexokinase 11 in Muscle from Non-Insulin-dependent Diabetes Mellitus Patients. Journal of Clinical Investigation, v. 96, n. 6, p. 2639–2645, 1995.

VIND, B. F. et al. Hyperglycaemia normalises insulin action on glucose metabolism but not the impaired activation of AKT and glycogen synthase in the skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 55, n. 5, p. 1435–1445, 2012.

VOGT, C. C. et al. Regulation of hexokinase II expression in human skeletal muscle in vivo. **Metabolism**, v. 49, n. 6, p. 814–818, 2000.

WANG, K. et al. miR-874 regulates myocardial necrosis by targeting caspase-8. Cell death & disease, v. 4, p. e709, 2013.

WANG, Q. et al. MicroRNA-377 is up-regulated and can lead to increased fibronectin production in diabetic nephropathy. **FASEB Journal**, v. 22, n. 12, p. 4126–4135, 2008.

WANG, X. et al. Determination of 14 circulating microRNAs in Swedes and Iraqis with and without diabetes mellitus type 2. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e86792, 2014.

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 855–862, 1993.

WITKOS, T. M.; KOSCIANSKA, E.; KRZYZOSIAK, W. J. Practical Aspects of microRNA Target Prediction. **Current Molecular Medicine**, v. 11, n. 2, p. 93–109, 2011.

WORDLE. Disponível em: <a href="http://www.wordle.net/">http://www.wordle.net/</a>. Acesso em: 10 de maio de 2015.

XIAO, F. et al. miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. **Nucleic** Acids Research, v. 37, n. Database, p. D105–D110, 2009.

YAN, S. T. et al. MiR-199a is overexpressed in plasma of type 2 diabetes patients which contributes to type 2 diabetes by targeting GLUT4. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 397, n. 1–2, p. 45–51, 2014.

YANG, X. et al. A lentiviral sponge for miRNA-21 diminishes aerobic glycolysis in bladder cancer T24 cells via the PTEN/PI3K/AKT/mTOR axis. **Tumor Biology**, v. 36, n. 1, p. 383–391, 2015.

YOUSSEF, D. et al. Fructosamine--an underutilized tool in diabetes management: case report and literature review. **Tennessee Medicine**, v. 101, n. 11, p. 31–33, 2008.

ZENG, L. Q. et al. Systematic profiling of mRNA and miRNA expression in the pancreatic islets of spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. **Molecular medicine reports**, v. 11, n. 1, p. 67–74, 2015.

ZHANG, L.-F. et al. Suppression of miR-199a maturation by HuR is crucial for hypoxiainduced glycolytic switch in hepatocellular carcinoma. **The EMBO journal**, v. 34, n. 21, p. 2671–2685, 2015.

ZHANG, P. et al. Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 87, n. 3, p. 293–301, 2010.

ZHANG, Q. et al. miR-375 and miR-30d in the effect of chromium-containing Chinese medicine moderating glucose metabolism. **Journal of Diabetes Research**, v. 2014, p. 862473, 2014.

ZHOU, P.; CHEN, W.; LI, X. MicroRNA-143 acts as a tumor suppressor by targeting hexokinase 2 in human prostate cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 5, n. 6, p. 2056–2063, 2015.

ZHOU, T. et al. Regulation of Insulin Resistance by Multiple MiRNAs via Targeting the GLUT4 Signalling Pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 2063–2078, 2016a.

ZHOU, Y. et al. MicroRNA-29a induces insulin resistance by targeting PPARδ in skeletal muscle cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 37, n. 4, p. 931–938, 2016b.

ZHU, H. et al. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. Cell, v. 147, n. 1, p. 81–94, 2011.

ZIERATH, J. R.; KROOK, A.; WALLBERG-HENRIKSSON, H. Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. **Diabetologia**, v. 43, n. 7, p. 821–35, jul. 2000.

ZISMAN, A. et al. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. **Nature medicine**, v. 6, n. 8, p. 924–928, 2000.

## APÊNDICES

Análise de correlação entre o transportador de glicose GLUT4 com os miRNAs alterados.



Figura 35 - Análise de correlação entre a proteína GLUT4 e miR-1 (painel A), miR-29b (painel B) e miR-29c (painel C) em músculo sóleo dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM. U.A.= unidades arbitrárias. A análise foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) ou Spearman (ρ), de acordo com a distribuição das amostras. A reta que representa a regressão linear foi inserida apenas para a correlação de Pearson e indicação na figura.



Figura 36 - Análise de correlação entre a proteína GLUT4 e miR-93 (painel A), miR-150 (painel B), miR-199a (painel C), miR-345-3p (painel D) e miR-532-3p (painel E) em músculo sóleo dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM. U.A.= unidades arbitrárias. A análise foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) ou Spearman (ρ), de acordo com a distribuição das amostras. A reta que representa a regressão linear foi inserida apenas para a correlação de Pearson e indicação na figura.



Análise de correlação entre a enzima hexokinase 2 (HK2) com os miRNAs alterados.

Figura 37 - Análise de correlação entre a proteína HK2 e miR-1 (painel A), miR-29b (painel B) e miR-29c (painel C) em músculo sóleo dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM. U.A.= unidades arbitrárias. A análise foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) ou Spearman (ρ), de acordo com a distribuição das amostras e indicação na figura.



Figura 38 - Análise de correlação de entre a proteína HK2 e miR-93 (painel A), miR-150 (painel B), miR-199a (painel C), miR-345-3p (painel D) e miR-532-3p (painel E) em músculo sóleo dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM. U.A.= unidades arbitrárias. A análise foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) ou Spearman (ρ), de acordo com a distribuição das amostras e indicação na figura.

Análise de correlação entre a enzima glicogênio sintase 1 (GYS1) com os miRNAs alterados.



Figura 39 - Análise de correlação entre a proteína GYS1 e miR-1 (painel A), miR-29b (painel B) e miR-29c (painel C) em músculo sóleo dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM. U.A.= unidades arbitrárias. A análise foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) ou Spearman (ρ), de acordo com a distribuição das amostras e indicação na figura.



Figura 40 - Análise de correlação de entre a proteína GYS1 e o miR-93 (painel A), miR-150 (painel B), miR-199a (painel C), miR-345-3p (painel D) e miR-532-3p (painel E) em músculo sóleo dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM. U.A.= unidades arbitrárias. A análise foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) ou Spearman (ρ), de acordo com a distribuição das amostras e indicação na figura.



Análise de correlação entre a glicemia com os miRNAs alterados.

Figura 41 - Análise de correlação entre a glicemia e miR-1 (painel A), miR-29b (painel B) e miR-29c (painel C) dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM. U.A.= unidades arbitrárias. A análise foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) ou Spearman (ρ), de acordo com a distribuição das amostras e indicação na figura.



Figura 42 - Análise de correlação de entre a glicemia e o miR-93 (painel A), miR-150 (painel B), miR-199a (painel C), miR-345-3p (painel D) e miR-532-3p (painel E) dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM. U.A.= unidades arbitrárias. A análise foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) ou Spearman (ρ), de acordo com a distribuição das amostras e indicação na figura.


Análise de correlação entre a glicosúria de 24 hs com os miRNAs alterados.

Figura 43 - Análise de correlação entre a glicosúria de 24 hs e miR-1 (painel A), miR-29b (painel B) e miR-29c (painel C) dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM. U.A.= unidades arbitrárias. A análise foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) ou Spearman (ρ), de acordo com a distribuição das amostras e indicação na figura.



Figura 44 - Análise de correlação de entre a glicosúria de 24 hs e o miR-93 (painel A), miR-150 (painel B), miR-199a (painel C), miR-345-3p (painel D) e miR-532-3p (painel E) dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM. U.A.= unidades arbitrárias. A análise foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) ou Spearman (ρ), de acordo com a distribuição das amostras e indicação na figura.



Por fim, realizamos a análise de correlação entre a frutosamina plasmática com os miRNAs alterados.

Figura 45 - Análise de correlação entre a frutosamina plasmática e miR-1 (painel A), miR-29b (painel B) e miR-29c (painel C) dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM. U.A.= unidades arbitrárias. A análise foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) ou Spearman (ρ), de acordo com a distribuição das amostras. A reta que representa a regressão linear foi inserida apenas para a correlação de Pearson e indicação na figura.



Figura 46 - Análise de correlação de entre a frutosamina plasmátiva e o miR-93 (painel A), miR-150 (painel B), miR-199a (painel C), miR-345-3p (painel D) e miR-532-3p (painel E) dos animais: não diabético (ND), diabético tratado com placebo (DP) e diabético tratado com insulina (DI). Valores expressos em média ± EPM. U.A.= unidades arbitrárias. A análise foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) ou Spearman (ρ), de acordo com a distribuição das amostras. A reta que representa a regressão linear foi inserida apenas para a correlação de Pearson e indicação na figura.