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

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*.

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 na captação de glicose, especialmente pela hiperinsulinização 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 s*olute 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 (*repressor*s) (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 1a* (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 1B* (NF1B), p*eroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPARalfa) e PPARgama (IM et al., 2007; KARNIELI; ARMONI, 2008; ZORZANO; PALACIN; 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 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

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 g*lycogen 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.

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

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

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.

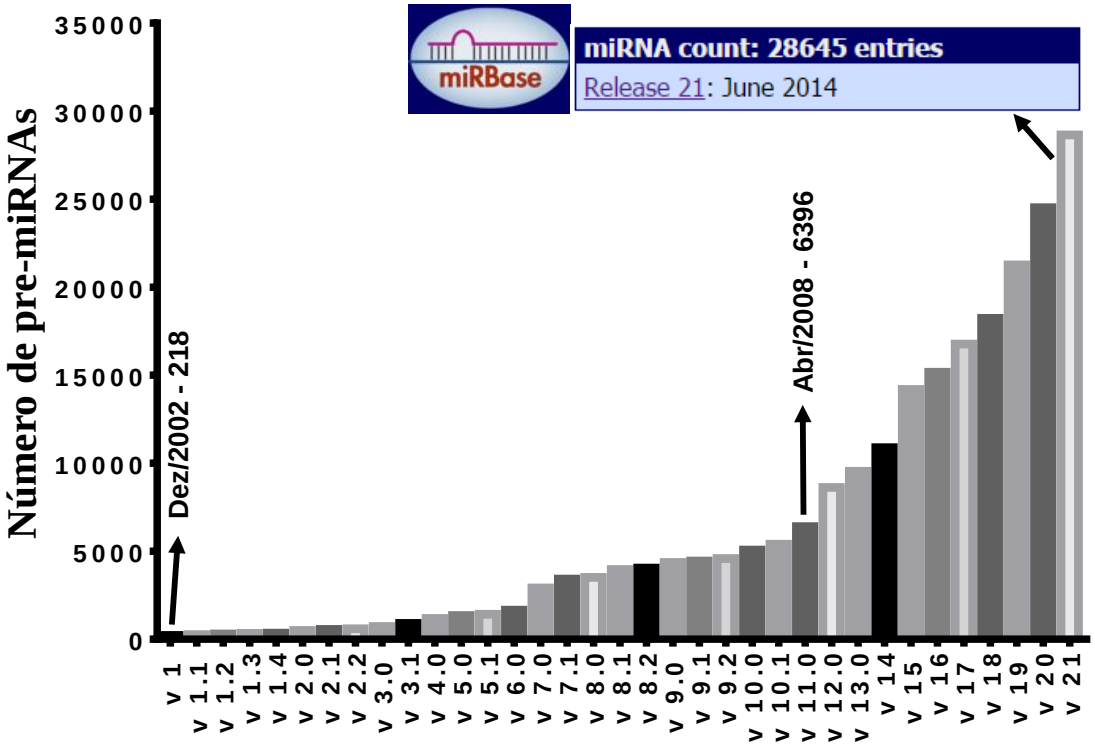

Figura 1 - Evolução no número de entradas (precursores *hairpins* de miRNAs) disponibilizadas temporalmente no miRBase. No eixo X, observam-se todas as versões (de v1 até v21) e respectivas entradas disponibilizadas ao longo do tempo no miRBase. Fonte: miRBase (2014).

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).

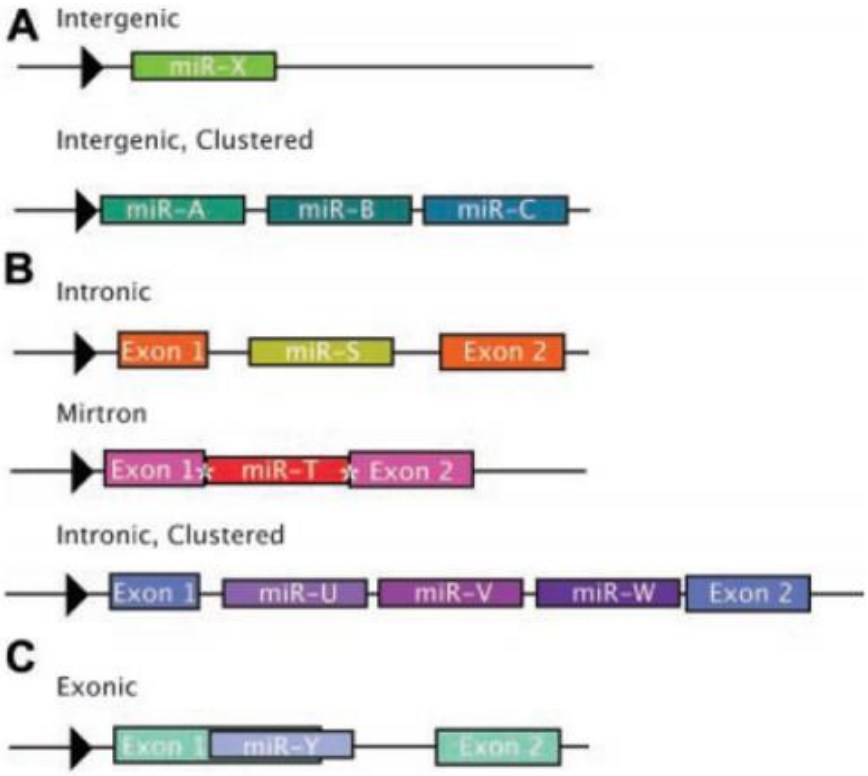

Figura 2 - Localização genômica dos miRNAs. A) miRNAs intergênicos e clusterizados; B) miRNAs intrônicos, miRtrons e clusterizados; C) miRNAs exônicos. Os detalhes são encontrados no texto. Fonte: modificada de Olena e Patton (2010).

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 *miRNA-inducing 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.

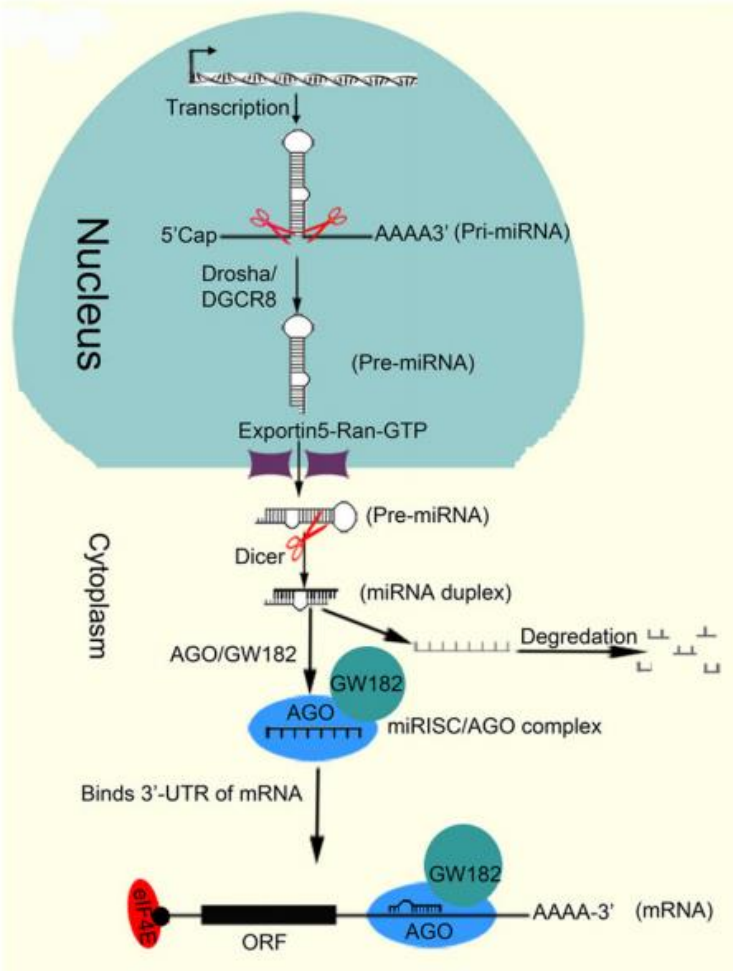

Figura 3 - Biogênese dos miRNAs. Mais detalhes estão descritos no texto. Fonte: modificada de Hussain (2012).

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), m*yc 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.

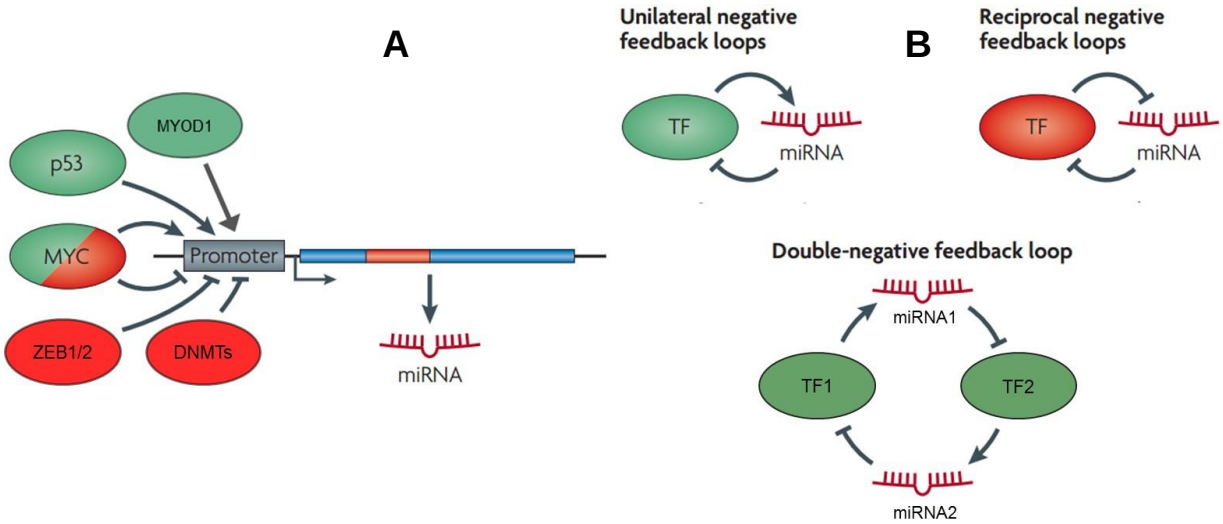

Figura 4 - Regulação da transcrição gênica de miRNAs. As regiões promotoras de genes de miRNA são altamente similares aquelas de genes codificadores de proteínas, com a presença de ilhas CpGs, sequencias TATA box, elementos de iniciação e certas modificações de histonas, indicando que são controladas 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.

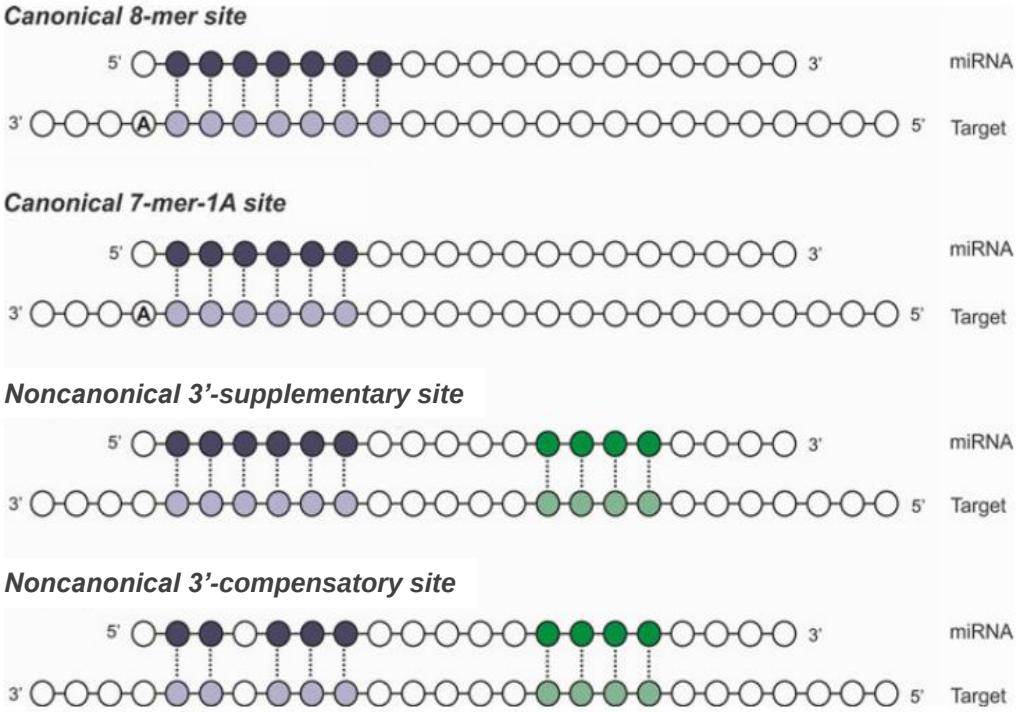

Figura 5 - Tipos de reconhecimento do miRNA com seu respectivo alvo. Sítios de reconhecimento canônicos (*canonical site*) são caracterizados por um pareamento direto entre a sequência semente do miRNA e a região alvo do mRNA compreendendo 6 ou 7 nucleotídeos, além de apresentar o nucleotídeo adenosina 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.

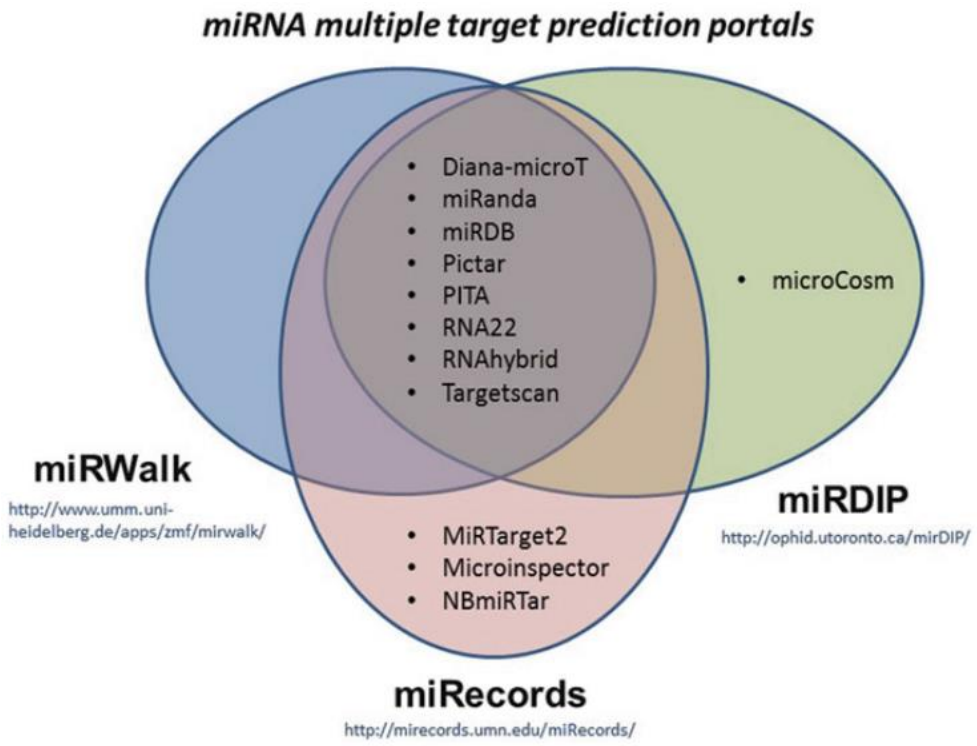

Figura 6 - Diagrama de Venn representando os algoritmos preditores de alvo de miRNAs usados pelos múltiplo-preditores miRWalk, miRecords e miRDIP. Fonte: modificada de Leitão, Costa e Enguita (2014).

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.

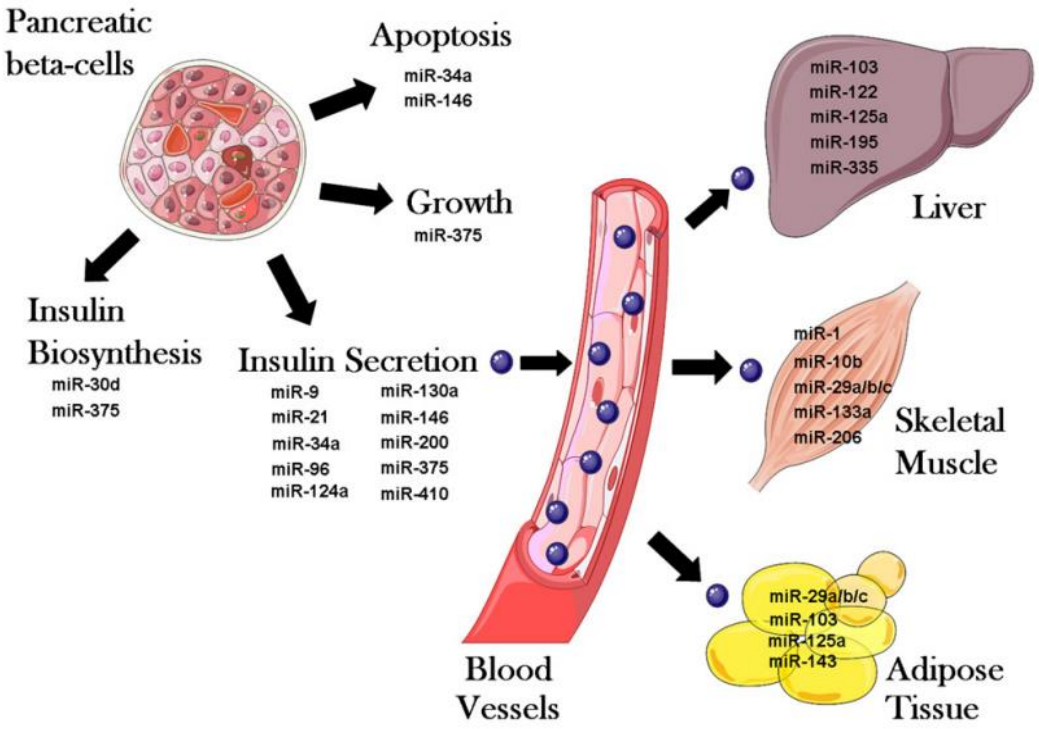

Figura 7 - MiRNAs envolvidos na regulação da função de células B e de tecidos alvo da insulina no contexto do diabetes. Fonte: Guay et al. (2011).

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 super-expressão 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 *HK2*.

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.

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 non-insulin 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. β-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.

---

*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 anti-diabetic 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-1α and HNF-3β. **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 ischemia-reperfusion 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-1α regulation. **Oncogenesis**, v. 5, n. 5, p. e224, 2016.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 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 microRNA-mediated 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: <http://www.mirbase.org/>. Acesso em 10 de junho de 2015.

miR2Disease Base. [Internet]. Indianapolis: Indiana University: School of Medicine. Disponível em: <http://www.mir2disease.org/>. 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: <http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference>. 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 β-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 ERα 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: <http://www.wordle.net/>. 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 hypoxia-induced 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.