

FLÁVIA DE TOLEDO FRIAS

Papel dos microRNAs (miR-1, miR-133, miR-206, miR-208b, miR-499 e miR-223) no músculo esquelético de camundongos C57BL/6 durante o estado de resistência à insulina.

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Alice Cristina Rodrigues

Versão Original

São Paulo
2016

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

1.1 Músculo esquelético e a β -oxidação mitocondrial

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

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

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

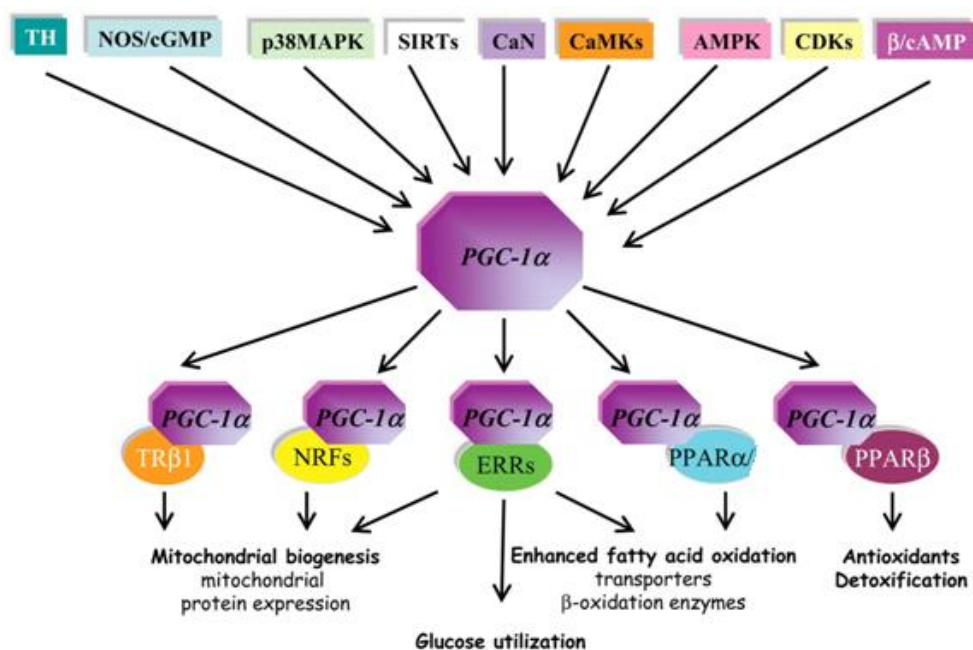


Figura 1. Cascata de regulação via PGC1 α . TH: Hormônio da tireoide; NOS/cGMP: óxido nítrico sintase; p38MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; SIRT6: sirtuínas, CaN: calcineurina; CaMKs: proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina; AMPK: proteína quinase ativada por AMP; CDKs: quinases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

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

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

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

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

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

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

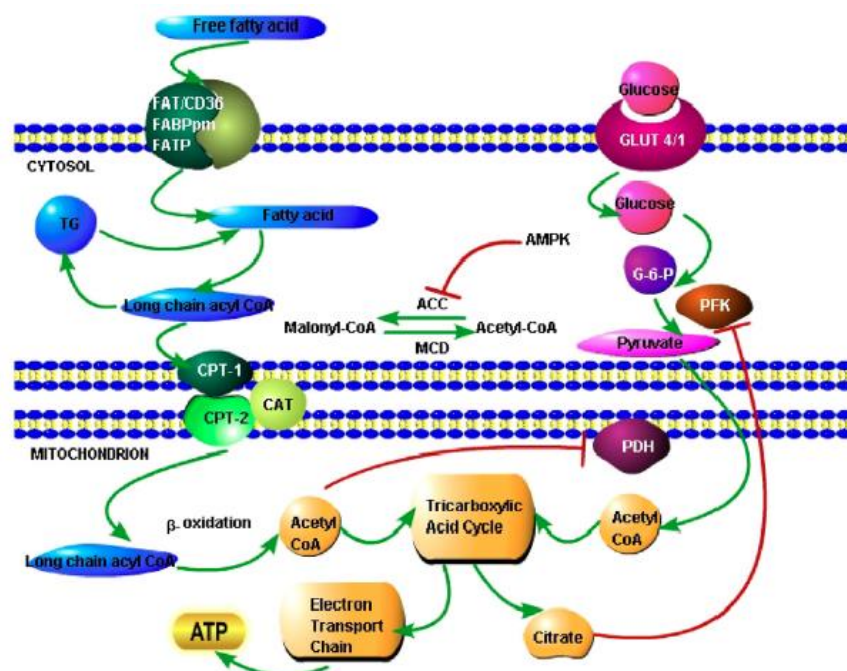


Figura 2. Metabolismo de ácidos graxos e o Ciclo de Randle. FAT/CD36, FABPpm, FATP: proteínas de membrana transportadoras de AGs; TG: triglicerídeos; CPT-1 e -2: carnitina palmitoiltransferases 1 e 2; ATP: adenosina trifosfato; ACC: acetil-CoA carboxilase; MCD: malonil-CoA descarboxilase; AMPK: proteína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

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

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

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

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

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

1.3 PPARs, metabolismo da glicose e de ácidos graxos

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

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

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

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

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

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

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

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

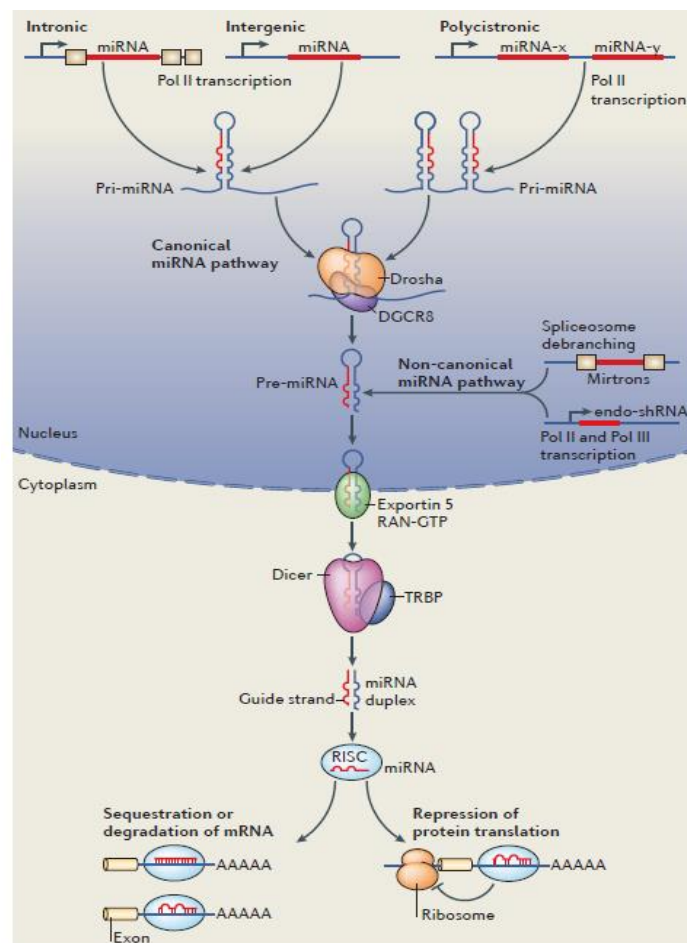


Figura 3. Biogênese dos miRNAs. miRNA: MicroRNA; pri-miRNA: miRNA primário; pré-miRNA: miRNA precursor; DGCR8: proteína ligadora de RNA dupla fita; TRBP: proteína

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

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

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

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

Em especial os miRNAs, miR-1a, miR-133a/b e miR-206 são expressos especificamente em músculo na forma de clusters. Em camundongos, os clusters miR-1a-1/miR-133a-2 estão localizados no cromossomo 2, o miR-1a-2/miR-133a-1 no cromossomo 18 e o cluster miR-206/miR-133b no cromossomo 1 (GOLJANEK-

WHYSALL et al., 2012). O miR-208b é codificado no íntron 31 do gene β -MHC (*Myh7*) do cromossomo 14 e o miR-499 no íntron 19 do *Myh7b* no cromossomo 2 (McGUIGAN; PHILLIPS; POSTLETHWAIT, 2004; VAN ROOJI et al., 2009).

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

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

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

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

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

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

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

5 CONCLUSÃO

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

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*De acordo com:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ROPELLE, E. R. et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. **J Physiol**, v. 577, n. Pt 3, p. 997-1007, Dec 2006. ISSN 0022-3751. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008371>>.

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

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

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

SCHMITZ-PEIFFER, C.; CRAIG, D. L.; BIDEN, T. J. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. **J Biol Chem**, v. 274, n. 34, p. 24202-24210, Aug 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10446195>>.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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