

MICRO-RNA, RESISTÊNCIA À INSULINA E EXERCÍCIO FÍSICO: AVANÇOS CIENTÍFICOS NO CONTROLE DA SÍNDROME METABÓLICA

Joaquim Maria Ferreira Antunes Neto¹,
 Natália Marquezini¹,
 Antoniana Dalalana Zaccarioto¹,
 Giovana Maria Silvério¹,
 Alexandra Paula da Silva¹,
 Eliane Avelino¹,
 Bruna Bergo Nader¹

RESUMO

Micro-RNAs (miRNAs) foram descritos como moléculas não codificadoras associadas com regulação gênica postranscricional podendo, portanto, regular processos de crescimento, diferenciação e metabólicos. Embora seus mecanismos ainda não sejam totalmente conhecidos, seu papel principal consiste na degradação do mRNA maduro ou inibição da tradução. Recentemente, o micro-RNA miR-335 foi validado para regular negativamente o sistema antioxidante enzimático, consequentemente favorecendo a ocorrência de estresse oxidativo, ao passo que, o micro-RNA miR-23 foi validado para inibir a expressão do PGC1 α e, consequentemente, reduzir a função mitocondrial. A resistência à insulina no músculo esquelético é uma característica em diabéticos. Embora seu mecanismo ainda não seja totalmente esclarecido, há correlação entre resistência à insulina e conteúdo de lipídios intracelulares. Existem muitas evidências que este mecanismo está acompanhado de uma baixa atividade mitocondrial e de aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), sugerindo que miRNAs possam estar expressos no tecido muscular com resistência a insulina.

Palavras-chave: síndrome metabólica, estresse oxidativo, inatividade física.

1-Instituto de Ensino Superior de Itapira - IESI, Curso de Graduação de Fisioterapia, Núcleo de Estudos Multidisciplinares do Estresse - NEME

ABSTRACT

Micro-RNA, Insulin Resistance and Physical Exercise: Scientific Advances in Control of Metabolic Syndrome

Micro-RNAs (miRNAs) molecules were described as non-coding postranscricional associated with gene regulation may therefore regulate processes of growth, differentiation and metabolism. Although its mechanisms not yet fully known, its primary role is to mature mRNA degradation or inhibition of translation. Recently, micro-RNA miR-335 was validated to negatively regulate the antioxidant system enzyme, thus favoring the occurrence of oxidative stress. While the micro-RNA miR-23 was validated to inhibit the expression of PGC1 α and hence reduce mitochondrial function. Insulin resistance skeletal muscle is a feature in diabetics. Although his mechanism is not fully understood, there is a correlation between insulin resistance and intracellular lipid content. There are many evidences that this mechanism is accompanied by a low activity mitochondria and increased production of reactive oxygen species (ROS) suggesting that miRNAs may be expressed in muscle tissue with insulin resistance.

Key words: metabolic syndrome, oxidative stress, physical inactivity.

E-mail:
 joaquim_netho@yahoo.com.br

Endereço para correspondência:
 Joaquim Maria Ferreira Antunes Neto
 Instituto de Ensino Superior de Itapira
 Avenida Rio Branco, 99
 Centro, Itapira-SP, Brasil
 CEP: 13970-070

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, modificações agressivas no estilo de vida acarretaram sensível diminuição do tempo livre das pessoas e concomitante redução nos níveis de atividade física, o que gerou impacto significativo sobre a saúde e a mortalidade nos grandes centros populacionais (Silva, Lima, 2002).

As alterações drásticas registradas em termos de saúde pública induziram elevação das doenças classificadas como de origem crônico-degenerativas (Rezende e colaboradores, 2004).

Doenças que acometiam mais a população infantil, como as infecciosas e parasitárias, tendem a perder importância em prol de outras, como as crônico-degenerativas mais incidentes na população adulta e idosa. Essas doenças, em geral, de longa duração vão se acumulando nos indivíduos, considerando o aumento relativo da proporção de idosos e a tendência crescente da expectativa de vida (Rezende e colaboradores, 2004).

A crescente incidência do diabetes mellitus (DM) na população mundial, nos últimos vinte anos, como a prevalência dos EUA chegando a 10 milhões de pessoas com DM tipo 2 (DM2) constituindo 5% da população americana, é uma das conseqüências mais graves dessas modificações (Duncan e colaboradores, 1992). Dados brasileiros sobre DM, reportando também a última década, demonstraram uma prevalência de 8% na população de 30 a 69 anos de idade. O estudo revelou também um alto grau de desconhecimento em relação à doença. Cerca de 50% dos diagnosticados não suspeitavam de que tinham diabetes (Barbosa e colaboradores, 2001).

A DM não é uma doença manifestada por circunstância isolada. A síndrome metabólica – também conhecida como síndrome X, síndrome da resistência à insulina, quarteto mortal ou síndrome plurimetabólica – é caracterizada pelo agrupamento de fatores de risco cardiovascular como hipertensão arterial, resistência à insulina, hiperinsulinemia, intolerância à glicose/DM2, obesidade central e dislipidemia (LDL-colesterol alto, triglicérides alto e HDL-colesterol baixo) (Ciolac, Guimarães, 1997).

Estudos epidemiológicos e clínicos têm demonstrado que a prática regular de atividade física é um importante fator para a prevenção e tratamento desta doença (Duncan e colaboradores, 1992).

A obesidade, até então vista como uma desordem primariamente de alta ingestão energética, hoje, levando-se em conta os princípios questionados pelos estudos sobre qualidade de vida, tende também a ser tratada como uma doença prevalente pelo baixo gasto energético que ao alto consumo calórico, surgindo a inatividade física como o maior fator etiológico para o crescimento desta doença nos grandes centros urbanos (Erikson e colaboradores, 1997).

O objetivo principal desta revisão é a abordagem dos mecanismos de ação do micro-RNAs enquanto indutores de resistência à insulina e a relação com estresse oxidativo e exercício físico.

Estresse Oxidativo e Resistência à Insulina

A resistência à ação da insulina no músculo esquelético é uma das principais características em indivíduos diabéticos. Embora o número de pesquisas nessa área tenha crescido exponencialmente, os mecanismos responsáveis pela instalação dessa patologia ainda não foram esclarecidos. Porém, há um consenso da existência de uma forte correlação entre resistência à insulina, inatividade e elevado conteúdo de lipídios intracelulares (Jenkins e colaboradores, 1988; Hawley e colaboradores, 2000; Hansson e colaboradores, 2005; Savage e colaboradores, 2007; Silveira e colaboradores, 2008).

Experimentalmente, esse quadro tem sido facilmente induzido em animais submetidos à dieta hiperlipídica (Brehm e colaboradores, 2006; Chanseume e colaboradores, 2006; Choi e colaboradores, 2007; Silveira e colaboradores, 2007) ou células isoladas expostas a altas concentrações de nutrientes incluindo ácidos graxos (Hirabara e colaboradores, 2007; Sabin e colaboradores, 2007; Lambertucci e colaboradores, 2008).

Randle e colaboradores (1963) foram os primeiros a demonstrarem que, sob elevada exposição aos ácidos graxos, a utilização de glicose é substancialmente reduzida nos tecidos periféricos incluindo o muscular. Este mecanismo foi originalmente proposto como

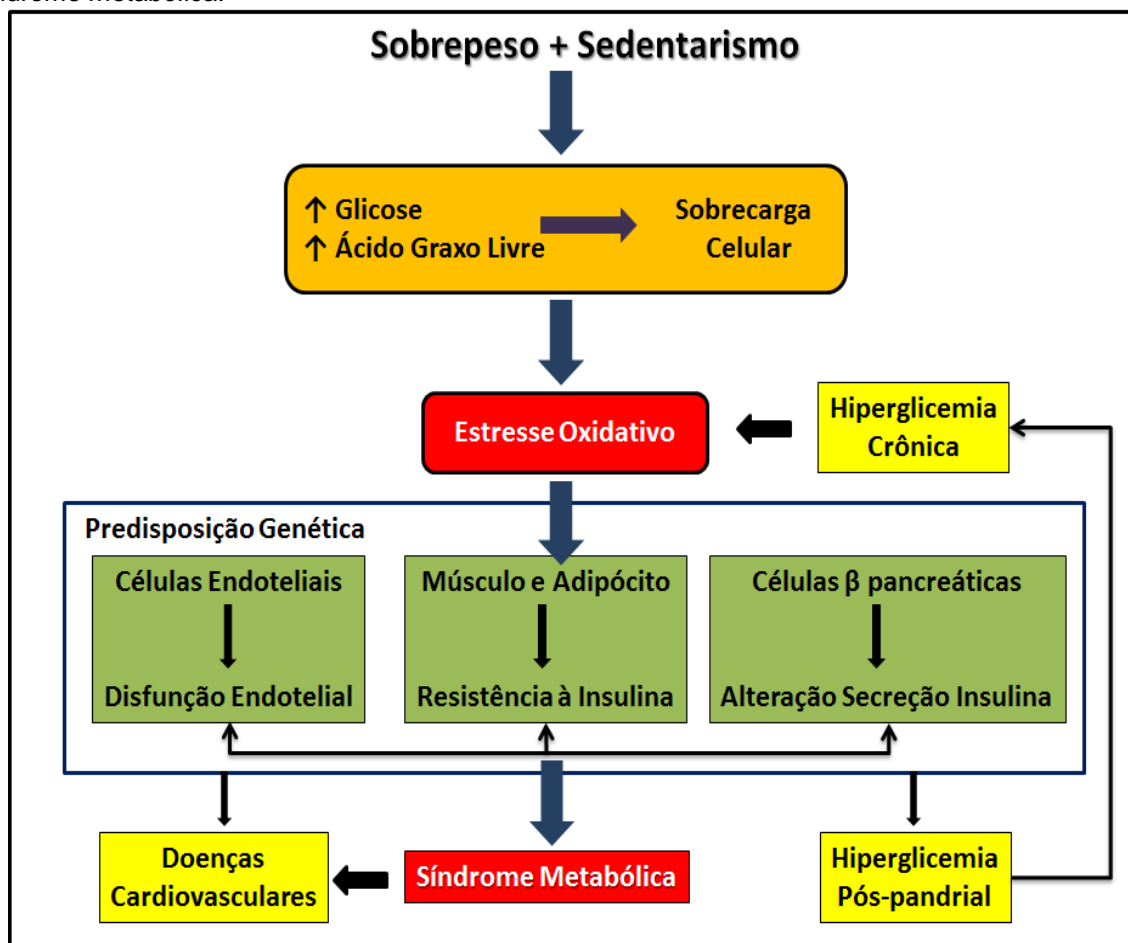
ciclo glicose-ácido graxo. Na última década, um número crescente de estudos mostrou ainda a existência de mecanismos moleculares associados à resistência à insulina. O DM2 induz inibição de componentes da via de sinalização da insulina causando prejuízos na transmissão do sinal deste hormônio (Jenkin e colaboradores, 1988; Hawley e colaboradores, 2000; Chanseume e colaboradores, 2006; Silveira e colaboradores, 2007; Hirabara e colaboradores, 2007; Silveira e colaboradores, 2008), sugerindo, portanto, que, a resistência à insulina pode estar associada a uma menor resposta durante o processo de fosforilação e ativação dos transportadores de glicose pela insulina. Observações demonstraram que este mecanismo está acompanhado de uma baixa atividade mitocondrial e de aumento na produção de espécies reativas de oxigênio

(EROs), induzindo estresse oxidativo (Griffin e colaboradores, 1999; Petersen e colaboradores, 2004; Savage e colaboradores, 2007) (**Figura 1**).

Curiosamente, indivíduos treinados fisicamente exibem um elevado conteúdo intramuscular de ácidos graxos (Van Loon, Goodspaster, 2006).

Porém, ao contrário de indivíduos sedentários, apresentam elevada capacidade mitocondrial e antioxidante, sendo, portanto, altamente sensíveis à insulina e sugerindo que a baixa capacidade mitocondrial associada ao aumento de espécies reativas de oxigênio são mesmo dois importantes fatores indutores de resistência a insulina (Griffin e colaboradores, 1999; Van Loon, Goodspaster, 2006; Savage e colaboradores, 2007; Silveira e colaboradores, 2008).

Figura 1 - Fatores metabólicos envolvidos no aumento do estresse oxidativo e desencadeamento da síndrome metabólica.



Estresse oxidativo pode ser definido como o desequilíbrio causado pelo excesso na produção das EROs associado à queda na capacidade antioxidante celular (Sies, 1997; Finkel, 2003; Scandalios, 2005).

As EROs podem ser derivadas de fontes exógenas ou produzidas endogenamente como consequência normal das funções celulares, por diversas enzimas que utilizam o oxigênio (O₂) como substrato (Finkel, Holbrook, 2000; Finkel, 2003).

Resultam da excitação do O₂ para formar oxigênio singleto (¹O₂) ou da redução do O₂, nas mitocôndrias, pela citocromo oxidase (aa₃) – que catalisa a transferência de um, dois e três elétrons – originando, respectivamente, radical superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila (OH[•]). Este processo de redução produz água (H₂O) como produto final da reação (Gutteridge, 1995; Sies, 1997).

As principais EROs dividem-se em radiculares e não-radicalares. Podem, ainda, reagir com outros átomos e formar espécies reativas, como o peroxinitrito (OONO⁻) – formado a partir da reação do óxido nítrico (NO) com O₂⁻ (Giasson e colaboradores, 2002).

Algumas destas espécies são extremamente instáveis, enquanto outras são livremente difusas e de meia-vida relativamente longa (Gutteridge, 1995). Por serem extremamente reativas, níveis elevados ou sustentados de EROs podem causar danos severos ao DNA (deleções, mutações e translocações; além de oxidação de filamentos), às proteínas (modificações locais específicas nos aminoácidos, fragmentação da

corrente do peptídeo e aumento da susceptibilidade da proteólise) e aos lipídios (alterações em propriedades de membranas biológicas) (Giasson e colaboradores, 2002; Scandalios, 2005).

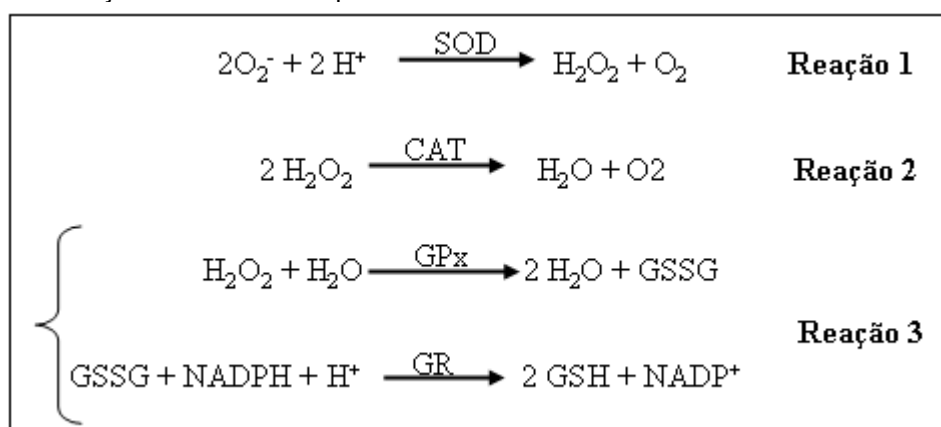
Tais circunstâncias podem conduzir à necrose ou apoptose, além de sinalização para ativação gênica de eventos patológicos que até então estavam “dormentes”. A literatura aponta que diversas doenças neuromusculares, neurodegenerativas e até mesmo o diabetes potencializam a ação celular de gerar as EROs (Butler e colaboradores, 2003).

A fim de minimizar os efeitos das EROs, organismos aeróbios desenvolveram mecanismos de defesa antioxidante (Finkel e colaboradores, 2003; Scandalios, 2005).

Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em concentrações mais baixas que a do substrato oxidável, é capaz de atrasar ou inibir significativamente a oxidação do mesmo. Para tanto, previnem a formação destas espécies; interceptam-nas assim que formadas; reparam o dano oxidativo ocasionado por elas; aumentam a eliminação das moléculas danificadas e aumentam a eliminação também das não excessivamente danificadas, para minimizar a formação de mutações (Gutteridge, 1995).

Os sistemas de defesa antioxidante são divididos em não-enzimático (SANE) e enzimático (SAE). Fazem parte do SANE pequenas moléculas como vitaminas C e E, flavonóides, selênio, bilirrubina, ácido úrico e carotenóides, derivadas principalmente da alimentação (Finkel, Holbrook, 2000; Butler e colaboradores, 2003).

Figura 2 - Reações estabelecidas pelas enzimas antioxidantes.



O SAE é constituído principalmente por três enzimas: Superóxido Dismutase (SOD); Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx). Estas enzimas oferecem proteção ao organismo através da remoção do radical superóxido (O_2^-) e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), convertendo-os em espécies menos reativas (Finkel e colaboradores 2003; Scandalios, 2005) (**Figura 2**).

A **Figura 2** mostra que a SOD catalisa a reação de conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (Reação 1); enquanto que a CAT e a GPx – esta juntamente com a Glutathione Redutase (GR) – são responsáveis pela redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 (Reações 2 e 3, respectivamente) (Gutteridge, 1995; Scandalios, 2005). Os grupamentos sulfidríla são compostos que possuem grande importância no sistema antioxidante por oferecerem suas ligações (–SH) a Glutathione (GSH), auxiliando, portanto, na atenuação das respostas de estresse oxidativo (Norberg, Arnér, 2001).

Resistência à Insulina e Exercício Físico

Especula-se que, sob elevada disponibilidade de substratos (ácidos graxos e glicose), a produção de espécies reativas de oxigênio é elevada, um efeito que é acompanhado de reduzida captação de glicose. Interessantemente, a superexpressão da enzima catalase foi capaz de reverter esse quadro de resistência à insulina. Embora esse efeito esteja bem estabelecido, o mecanismo por trás desse processo ainda é desconhecido. Resultados preliminares mostram que nessas condições o consumo de oxigênio é reduzido seguido de uma elevada razão $NADH/NAD^+$. Interessantemente, a contração muscular, um conhecido estímulo de redução da razão $NADH/NAD^+$, reverte o quadro de resistência à insulina imposta pela exposição ao ácido palmítico, sugerindo que o aumento na produção de EROs induzido pelo acúmulo de $NADH$ possa estar sinalizando um excesso de energia intracelular e, portanto, redução na captação de glicose (dados não publicados). Esses achados fortalecem o conceito da sobrecarga de nutrientes mitocondrial como um dos principais indutores da resistência à insulina no tecido muscular, pois sabidamente o exercício agudo não é capaz de induzir as adaptações inerentes ao

exercício crônico, como é o caso do aumento de biogênese mitocondrial (Edgerton e colaboradores, 2009).

Em acordo com essa hipótese, Anderson e colaboradores (2009) observaram que animais submetidos a uma dieta rica em lipídios apresentaram um aumento na produção de H_2O_2 mitocondrial em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético, sugerindo, portanto, um efeito direto dos ácidos graxos no aumento da produção de EROs mitocondrial.

O exercício agudo é capaz ainda de reduzir o conteúdo intracelular de ácidos graxos e seus derivados, sendo estes importantes moléculas indutoras do quadro de resistência à insulina (Hawley e colaboradores, 2006; Silveira e colaboradores, 2007).

Esse tipo de atividade é conhecido também por aumentar a translocação dos transportadores de glicose (Glut-4) no tecido muscular por um mecanismo independente de insulina, supostamente ativado por aumentos nas concentrações citosólicas de Ca^{++} (Celi, Shuldiner, 2002; Muoio, Koves, 2002; Puigserver, Spiegelman, 2003).

Nessas condições, o aumento na razão $NADH/NAD^+$ favorece a inibição da proteína Sirt1 requerida no processo de ativação do co-fator de transcrição PGC1 α , um mecanismo estabelecido de estimulação do processo de biogênese mitocondrial (Lin e colaboradores, 2002).

Em contraste, o exercício físico, um modelo conhecido de indução da atividade mitocondrial, pode reverter esse processo (Narkar e colaboradores, 2008). Embora os fatores ambientais como dieta e nível de atividade física exibem um papel de destaque na indução do diabetes, há evidências de que sem a predisposição genética, esses fatores não são suficientes para indução da resistência à insulina (Luquet e colaboradores, 2003; Tanaka e colaboradores, 2003).

Análise de transcriptoma tem mostrado que a transcrição de um número grande de genes associados ao metabolismo oxidativo foi reduzida no tecido muscular de animais diabético (Gilde, Van Bielsen, 2003).

Combinado a análise proteômica, esse efeito foi observado para reduzir o conteúdo de proteínas associadas ao metabolismo de glicose e ácidos graxos nos tecidos adiposo branco e marrom, hepático e muscular incluindo a citocromo c redutase, α/β -enolase,

β -hidroxiacil-CoA desidrogenase, malato desidrogenase, α -cetoglutarato desidrogenase, ATP sintetase, glutationa-S transferase (Hirabara e colaboradores, 2007).

Esses achados sugerem que manipulações genéticas com a superexpressão ou inibição de genes que codificam proteínas incluindo fatores de transcrição associados ao metabolismo de lipídio e glicose podem reverter ou mesmo estimular o quadro de resistência a insulina no tecido muscular (Ryder e colaboradores, 2003; Wang e colaboradores, 2004; Silveira e colaboradores, 2006; Hakimi e colaboradores, 2007; Muoio, Newgard, 2008).

Foi demonstrado que a superexpressão do PPAR- β aumentou a transcrição de diversos genes associados ao metabolismo oxidativo incluindo o PGC-1 α (indutor de biogênese mitocondrial) e genes do metabolismo de ácidos graxos, resultando no aumento da capacidade mitocondrial. Interessante, o tratamento por quatro semanas com o agonista de PPAR- β (GW1516) ou com AICAR, um conhecido ativador da AMPK, aumentou a distância percorrida e o tempo de exaustão desses animais, sugerindo, aparentemente que, a manipulação do PPAR- β ou da proteína AMPK, pode reverter o quadro de resistência à insulina através do aumento da capacidade mitocondrial (Narkar e colaboradores, 2008).

Hakimi e colaboradores (2007) demonstraram que camundongos superexpressando a enzima PEPCK (Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase), uma proteína expressa em baixas quantidades no tecido muscular, tiveram uma capacidade de corrida e consumo máximo de oxigênio substancialmente maiores comparado aos animais controles. Em adição, esses animais apresentaram um maior conteúdo mitocondrial, seguido de maior tempo de vida comparado aos controles. Apesar do baixo conteúdo, a PEPCK no tecido muscular está envolvida com a entrada de carbonos no ciclo do ácido tricarboxílico (anaplerose), sugerindo, portanto, que, nessas condições, a PEPCK pode ter favorecido a produção de energia oxidativa.

Em estudos *in vitro*, Michael e colaboradores (2001) mostraram em cultura de células musculares que a superexpressão do cofator de transcrição PGC1 α aumentou o conteúdo da proteína transportadora de

glicose (Glut-4), um efeito que foi correlacionado ao aumento na captação de glicose, sugerindo uma forte associação entre aumento da capacidade oxidativa imposta pelo PGC1 α e melhora da captação de glicose.

Similarmente, Huppertz e colaboradores (2001) observaram que a superexpressão da proteína mitocondrial desacopladora UCP3, esperada para melhorar o consumo de oxigênio, aumentou o transporte de glicose em células musculares. Esse efeito foi associado à maior atividade da proteína da via de sinalização da insulina, PI3K, evidenciando melhora na resposta à insulina.

Muitos outros grupos têm dedicado com sucesso ao estudo de manipulações genéticas em células isoladas e em camundongos transgênicos com o propósito de reverter o processo de resistência a insulina (Michael e colaboradores, 2001; Ryder e colaboradores, 2003; Boden e colaboradores, 2005; Muoio, Newgard, 2008).

Influência dos Micro-Rnas na Indução da Resistência à Insulina

Recentemente, uma nova classe de moléculas, os micro-RNAs (miRNA), foram descritos para exercerem papel regulador em diferentes processos celulares incluindo proliferação celular, apoptose, diferenciação e metabolismo (Mette e colaboradores, 2000; Lim e colaboradores, 2003; Metzler e colaboradores, 2004; Chen, Lodish, 2005; Mahoney e colaboradores, 2005; Moore e colaboradores, 2010).

Os miRNAs são pequenos RNAs endógenos (21-22 nucleotídeos) não-codificantes que controlam a expressão gênica através da ligação em sítios específicos da região 3'-não traduzidas (3'-UTR) de RNAs mensageiros, causando repressão da tradução ou degradação de RNAs mensageiros (Bartel, 2004; Ambros, 2004).

O primeiro miRNA, denominado *lin-4*, foi descoberto por Victor Ambros e colaboradores em *C. elegans* (Lee e colaboradores, 1993; Ambros, 2004). Esses pesquisadores demonstraram que o *lin-4* apresentava complementaridade parcial com a região 3'-UTR do RNAm da proteína Lin-14, sugerindo um novo mecanismo de regulação gênica pos-transcricional.

Até o momento, mais de 500 miRNAs diferentes foram identificados em humanos e estudos bioinformáticos estimam que este número supere 1000 miRNAs, constituindo uma das maiores classes de reguladores gênicos (Wheeler e colaboradores, 2007; Wahid e colaboradores, 2010).

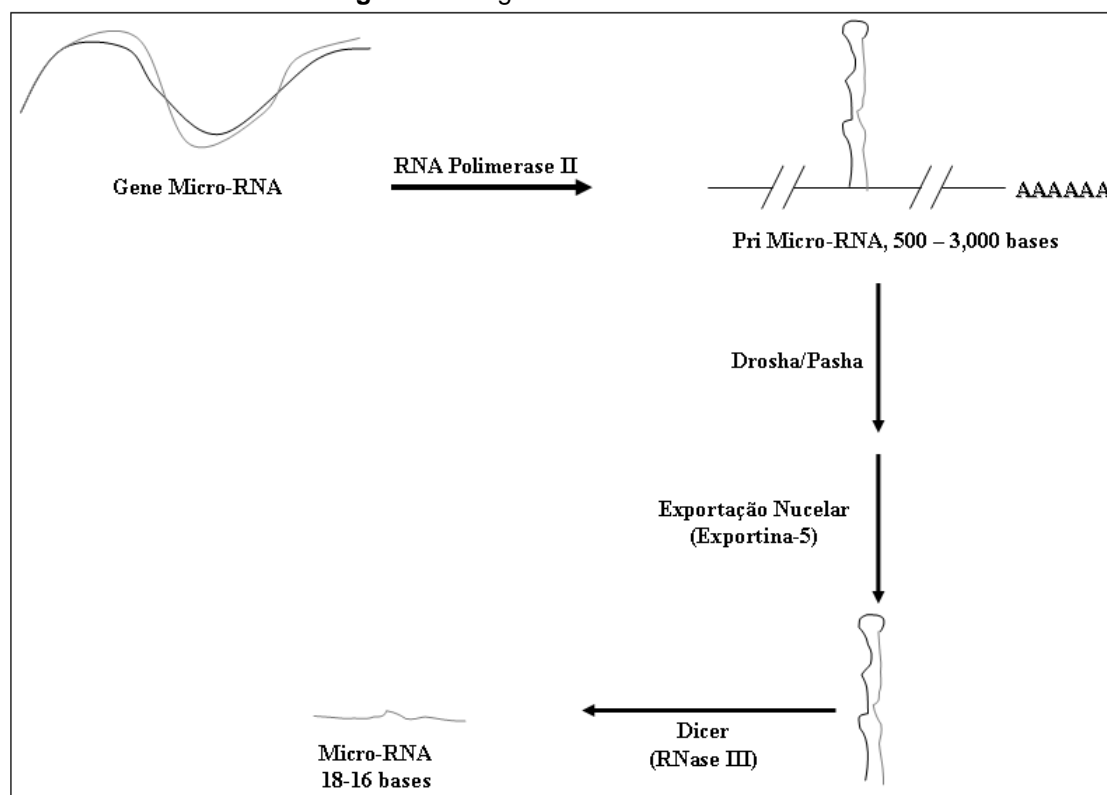
Os genes de miRNAs podem ser localizados nas regiões entre os genes codificadores de proteínas (regiões intergênicas), em íntrons de genes codificadores para proteína ou de genes não-codificadores e podem ainda estar presentes em éxons de genes não-codificadores (Rodriguez e colaboradores, 2004).

Esses genes são transcritos em um RNAm denominado pri-miRNA, que apresenta

o CAP-5', cauda poli-A em uma estrutura de dupla hélice do tipo "hairpin" (~70 nucleotídeos), sendo processados no núcleo por uma ribonuclease do tipo III denominada Drosha.

O produto do processamento da Drosha é denominado de precursor do miRNA (pri-miRNA), o qual migra para o citoplasma por meio de uma proteína carreadora (Exportina-5) e pela ação de outra ribonuclease (III), denominada Dicer, dará origem ao miRNA de fita simples contendo 21-22 nucleotídeos (Lee e colaboradores, 2003; Meister e colaboradores, 2004; Karube e colaboradores, 2005) (**Figura 3**).

Figura 3 - Biogênese dos Micro-RNAS.



O miRNA maduro de fita simples é incorporado a um complexo protéico denominado RISC (RNA-induced silencing complex), o qual pode efetuar a regulação negativa da expressão de genes por dois principais mecanismos: clivagem do RNAm ou repressão traducional.

Uma vez incorporado no RISC citoplasmático, o miRNA especificará a

clivagem do RNAm quando ocorrer complementaridade com o RNAm alvo ou repressão da tradução no caso de apresentar complementaridade parcial com o RNAm alvo (Hutvágne, Zamore, 2002; Zeng e colaboradores, 2002; Doench, Sharp, 2003; Mahoney e colaboradores, 2004; Nilsen, 2007).

Estimativas sugerem que 30% dos RNA mensageiros humanos sejam alvos da regulação por miRNAs (Lewis e colaboradores, 2005).

O diabetes leva a mudanças no perfil de expressão de muitos miRNAs em diferentes tecidos como retina, músculo, fígado, pâncreas, coração e rim (Tang e colaboradores, 2008; Gallagher e colaboradores, 2010; Herrera e colaboradores, 2010; Guay e colaboradores, 2011).

Porém, a função destes miRNAs no diabetes é complexa, podendo levar a causa de um estado inicial ou mesmo consequência de um estado crônico do diabetes (Poy e colaboradores, 2004).

Entretanto, a participação de miRNAs nas complicações associadas ao diabetes tem sido pouco investigada. A recente descoberta do *miR-375*, um miRNA expresso especificamente nas ilhotas pancreáticas, revelou um novo componente do sistema de proteínas responsável pela secreção da insulina, sugerindo, portanto, o papel do *miR-375* na homeostase de glicose. O *miR-375* inibe a secreção de insulina nas células β pancreáticas de camundongo, através da regulação negativa inibindo a expressão de miotrofina, uma proteína citoplasmática envolvida na exocitose de grânulos de insulina (Cardinali e colaboradores, 2004; Krek e colaboradores, 2005).

Além disso, *miR-124* e *let-7b* atuam em conjunto com *miR-375* no controle da expressão da miotrofina (Cardinali e colaboradores, 2004). Outros 67 miRNAs foram também identificados em células β pancreáticas (Krek e colaboradores, 2005). Juntos, esses dados sugerem o envolvimento de miRNAs no processo de secreção de insulina, no controle glicêmico e na resistência a insulina.

Os dados de miRNA em músculo estão direcionados principalmente aos processos de diferenciação e proliferação celular (Chen e colaboradores, 2006). A importância dos miRNAs no desenvolvimento das células musculares tem sido amplamente relatada e alguns miRNAs foram descritos como músculo-específicos como o *miR-1* e o *miR-133* (Lyng e colaboradores, 2001; Chen e colaboradores, 2006; McCarthy e colaboradores, 2009; Nielsen e colaboradores, 2010).

Um estudo de McCarthy e colaboradores (2009) relacionou a expressão e função de miRNAs ao desenvolvimento de atrofia muscular. Foram avaliadas as expressões de 151 miRNAs em músculo sóleo de ratos submetidos à suspensão dos membros posteriores e, destes, 18 miRNAs apresentaram alteração na expressão dentre eles o *miR-499*, um miRNA músculo-específico cuja expressão reduzida leva a superexpressão de seu alvo Sox6, um conhecido repressor da cadeia da miosina β (β -MHC), contribuindo para o estabelecimento da atrofia muscular (McCarthy e colaboradores, 2009).

Foi demonstrado ainda o envolvimento do *miR-696* na biogênese mitocondrial através da determinação do conteúdo de PGC-1 α . Este miRNA encontra-se superexpresso em músculo gastrocnêmio de camundongos imobilizados e com expressão reduzida no mesmo tecido de animais fisicamente treinados, mostrando um perfil de expressão inversamente proporcional ao de PGC-1 α . Em adição, foi observado redução da biogênese mitocondrial e da oxidação de ácidos graxos em miócitos superexpressando *miR-696* (Chen e colaboradores, 2005).

Uma consequência da resistência à insulina na musculatura esquelética é o aumento de estresse oxidativo imposto pela reduzida atividade antioxidante (Krek e colaboradores, 2005).

O cofator de transcrição PGC1 α tem sido descrito para regular não somente a expressão de proteínas mitocondriais (ciclo do ácido tricarbóxico e cadeia de transporte de elétrons), mas também de proteínas antioxidantes incluindo SOD, catalase e glutathione peroxidase, além da UCP2/3, esta última associada à regulação da produção de EROs mitocondrial (Hirabara e colaboradores, 2007; Sabin e colaboradores, 2007; Lambertucci e colaboradores, 2008). Puigserver e Spiegelman (2002) demonstraram consistentemente em células neuronais uma forte relação entre conteúdo de PGC1 α e sistema antioxidante. Após inibição da transcrição do PGC1 α usando siRNA foi observado uma drástica redução na transcrição das proteínas SOD, catalase, glutathione peroxidase e UCP.

Ao contrário, sob elevada expressão de PGC1 α , foi observado aumento da expressão dessas proteínas. Porém, em

experimentos em andamento no meu laboratório, esse sincronismo aparente entre PGC1 α e capacidade oxidativa/sistema antioxidante foi substancialmente reduzido sob crônica e elevada disponibilidade de EROs, indicando que nessas condições o conteúdo de PGC1 α pode ser reduzido. Estamos mostrando através de estudos preliminares que células-tronco musculares cultivadas *in vitro* e incubadas com ácido graxo palmítico apresentam uma baixa capacidade respiratória como demonstrado pela reduzida transcrição do PGC1, reduzida atividade da enzima mitocondrial citrato sintase e do consumo de oxigênio um efeito acompanhado de baixa atividade antioxidante e conseqüentemente elevada produção de EROs.

Esses achados sugerem que ambos PGC1 α e sistema antioxidante podem exercer um papel central na instalação da resistência a insulina no tecido muscular. Recentemente, o miRNA *miR-23* foi validado para inibir a expressão do PGC1 α e conseqüentemente reduzir a função mitocondrial.

Em um estudo recente, Safdar e colaboradores (2011) mostraram em músculo esquelético de camundongos que o exercício oxidativo diminuiu substancialmente a expressão do *miR-23*, um regulador negativo do PGC-1 α , um efeito que foi relacionado com o aumento da expressão gênica e do conteúdo de PGC-1 α em conjunto com alvos do PGC-1 α incluindo citrato sintase e citocromo c oxidase.

A resistência à insulina no músculo esquelético é uma característica em diabéticos.

Embora seu mecanismo ainda não seja totalmente conhecido, há correlação entre resistência à insulina e conteúdo de lipídios intracelulares.

Existem muitas evidências que este mecanismo está acompanhado de uma baixa atividade mitocondrial e de aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

O *miR-335* foi validado para regular negativamente o sistema antioxidante enzimático, conseqüentemente favorecendo a ocorrência de estresse oxidativo. Dessa forma, seria esperado aumento desse micro-RNA no tecido muscular esquelético resistente à insulina, uma condição estabelecida de estresse oxidativo.

CONCLUSÃO

Com base nesses achados, estudos emergentes caminham para manipular geneticamente os miRNAs *miR-23* e *miR-335*, os quais foram descritos por estarem associados à regulação do metabolismo celular e mitocondrial, em condições de desenvolvimento patológico bem como com a introdução do exercício em modelos animais.

O propósito, portanto, seria de melhorar a respiração mitocondrial e, conseqüentemente, o metabolismo de glicose e ácidos graxos em células musculares em cultura e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- 1-Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. Vol. 16. p. 350-355. 2004. Anderson, E. J.; e colaboradores. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *Journal of Clinical Investigation*. Vol. 119. p. 573-581. 2009.
- 2-Barbosa, R. B.; e colaboradores. Campanha nacional de detecção de casos de diabetes mellitus no Brasil: relatório preliminar. *Pan American Journal of Public Health*. Vol. 10. p. 324-327. 2001.
- 3-Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. Vol. 116. p. 281-297. 2004.
- 4-Boden, G.; e colaboradores. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor- κ B pathway in rat liver. *Diabetes*. Vol. 54. p. 3458-3465. 2005.
- 5-Brehm, A.; e colaboradores. Increased lipid availability impairs insulin-stimulated ATP synthesis in human skeletal muscle. *Diabetes*. Vol. 55. p. 136-140. 2006.
- 6-Butler, A. E.; e colaboradores. β -Cell Deficit and Increased β -Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes. *Diabetes*. Vol. 52. p. 102-110. 2003.

7-Cardinali, B.; e colaboradores. MicroRNA-221 and MicroRNA-222 Modulate Differentiation and Maturation of Skeletal Muscle Cells. PLoS ONE. Vol. 4. p. e7607. 2004.

8-Celi, F. S.; Shuldiner, A. R. The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and obesity. Current Diabetes Reports. Vol. 2. p. 179-185. 2002.

9-Chanseume, E.; colaboradores. Impaired resting muscle energetics studied by ³¹P-NMR in diet-induced obese rats. Journal of Nutrition. Vol.136. p. 2194-2200. 2006.

10-Chen, J. F.; colaboradores. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. Nature Genetics. Vol. 38. p. 228-233. 2006.

11-Chen, C.; e colaboradores. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic Acids Research. Vol. 33. p. 179. 2005.

12-Chen, C. Z.; Lodish, H. F. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. Seminars in Immunology. Vol. 17. p. 155-165. 2005.

13-Choi, C. S.; e colaboradores. Continuous fat oxidation in acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity. Proceedings of National 14

14-Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 104. p. 16480-16485. 2007.

15-Ciolac, E. G.; Guimarães, G. V. Exercício físico e síndrome metabólica. Revista Brasileira de Medicina do Esporte. Vol. 10. p. 319-324. 2004.

16-Doench, J.G.; Sharp, P. A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. Genes & Development. Vol. 17. p. 438-442. 2003.

17-Duncan, B. B.; e colaboradores. Altos coeficientes de mortalidade em populações adultas brasileiras: uma comparação internacional. Revista da Associação Médica Brasileira. Vol. 38. p. 138-144. 1992.

18-Edgerton, D. S.; e colaboradores. Effects of insulin on the metabolic control of hepatic gluconeogenesis in vivo. Diabetes. Vol. 58. p. 2766-2775. 2009.

19-Eriksson, J.; e colaboradores. Exercise and the metabolic syndrome. Diabetologia. Vol. 40. p. 125-135. 1997.

20-Griffin, M. E.; e colaboradores. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activity of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling pathway. Diabetes, v. 48, p. 1270-1274, 1999.

21-Gutteridge, J. M. C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clinical Chemistry. Vol. 41. p. 1819-1828. 1995.

22-Finkel, T. Oxidant signals and oxidative stress. Current Opinion in Cell Biology. Vol. 15. p. 247-254. 2003.

23-Finkel, T.; Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. Vol. 408. p. 239-247. 2000.

24-Gallagher, I. J.; e colaboradores. Integration of microRNA changes in vivo identifies novel molecular features of muscle insulin resistance in type 2 diabetes. Genome Medicine. Vol. 2. p. 9. 2010.

25-Giasson, B. I.; e colaboradores. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. Free Radical in Biology and Medicine. Vol. 32. p. 1264-1275. 2002.

26-Gilde, A. J.; Van Bilsen, M. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): regulators of gene expression in heart and skeletal muscle. Acta Physiologica Scandinavica. Vol. 178. p. 425-434. 2003.

27-Guay, C.; e colaboradores. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? Translational Research. Vol. 157. p. 253-264. 2011.

28-Hakimi, P.; e colaboradores. Overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in skeletal muscle repatterns energy metabolism

in the mouse. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 282. p. 32844-32855. 2007.

29-Hansson, O.; e colaboradores. Transcriptome and proteome analysis of soleus muscle of hormone-sensitive lipase-null mice. *Journal of Lipid Research*, v. 46, p. 2614-2623, 2005.

30-Hawley, J. A.; e colaboradores. Signalling mechanisms in skeletal muscle: role in substrate selection and muscle adaptation. *Essays in Biochemistry*. Vol. 42. p. 1-12. 2006.

31-Hawley, J. A.; e colaboradores. Effect of altering substrate availability on metabolism and performance during intense exercise. *Brazilian Journal of Nutrition*. Vol. 84. p. 829-838. 2000.

32-Herrera, B. M.; e colaboradores. Global microRNA expression profiles in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2. *Diabetologia*. Vol. 53. p. 1099-1109. 2010.

33-Hirabara, S. M.; e colaboradores. Time-dependent effects of fatty acids on skeletal muscle metabolism. *Journal of Cellular Physiology*. Vol. 210. p. 7-15. 2007.

34-Huppertz, C.; e colaboradores. Uncoupling Protein 3 (UCP3) Stimulates Glucose Uptake in Muscle Cells through a Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 276. p. 12520-12529. 2001.

35-Hutvagner, G.; Zamore, P. D. A microRNA in a Multiple-Turnover RNAi Enzyme Complex. *Science*. Vol. 297. p. 2056-2060. 2002.

36-Jenkins, A. B.; e colaboradores. Effects of nonesterified fatty acid availability on tissue-specific glucose utilization in rats in vivo. *Journal of Clinical Investigation*. Vol. 82. p. 293-299. 1988.

37-Karube, Y.; e colaboradores. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Science*. Vol. 96. p. 111-115. 2005.

38-Krek, A.; e colaboradores. Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics*. Vol. 37. p. 495-500. 2005.

39-Lambertucci, R. H.; e colaboradores. Palmitate increases superoxide production through mitochondrial electron transport chain and NADPH oxidase activity in skeletal muscle cells. *Journal of Cellular Physiology*. Vol. 216. p. 796-804. 2008.

40-Lee, R. C.; e colaboradores. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. Vol. 3. p. 843-854. 1993.

41-Lee, Y.; e colaboradores. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature*. Vol. 425. p. 415-419. 2003.

42-Lewis, B. P.; e colaboradores. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. Vol. 120. p. 15-20. 2005.

43-Lim, L. P.; e colaboradores. Vertebrate MicroRNA Genes. *Science*. Vol. 299. p. 1540. 2003.

44-Lin, J.; e colaboradores. Transcriptional co-activator PGC-1[alpha] drives the formation of slow-twitch muscle fibers. *Nature*. Vol. 418. p. 797-801. 2002.

45-Lyng, J.; e colaboradores. Extracellular formation and uptake of adenosine during skeletal muscle contraction in the rat: Role of adenosine transporters. *Journal of Physiology*. Vol. 537. p. 597-1005. 2001.

46-Luquet, S.; e colaboradores. Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *FASEB Journal*. Vol. 17. p. 2299-2301. 2003.

47-Mahoney, D. J.; e colaboradores. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *FASEB Journal*. Vol. 19. p. 1498-1500. 2005.

48-Mccarthy, J. J.; e colaboradores. Evidence of MyomiR network regulation of beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy. *Physiological Genomics*. Vol. 39. p. 219-226. 2009.

- 49-Meister, G.; e colaboradores. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell*. Vol. 15. p. 185-197. 2004.
- 50-Mette, M. F.; e colaboradores. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO Journal*. Vol. 19. p. 5194-5201. 2000.
- 51-Metzler, M.; e colaboradores. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. Vol. 39. p. 167-169. 2004.
- 52-Moore, K. J.; e colaboradores. MicroRNAs and cholesterol metabolims. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. Vol. 12. p. 699-706. 2010.
- 53-Michael, L. F.; e colaboradores. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 98. p. 3820-3825. 2001.
- 54-Muoio, D. M.; Newgard, C. B. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Vol. 9, p. 193-205, 2008.
- 55-Muoio, D. M.; Koves T. R. Skeletal muscle adaptation to fatty acid depends on coordinated actions of the PPARs and PGC1 α : implications for metabolic disease. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 277. p. 26089-26097. 2002.
- 56-Narkar, V. A.; e colaboradores. AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell*. Vol. 134. p. 405-414. 2008.
- 57-Nielsen, M.; e colaboradores. MicroRNA identity and abundance in porcine skeletal muscles determined by deep sequencing. *Animal Genetics*. Vol. 41. p. 159-168. 2010.
- 58-Nilsen, T. W. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends in Genetics*. Vol. 23. p. 243-249. 2007.
- 59-Nordberg, J.; Arnér, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical in Biology and Medicine*. Vol. 31. p. 1287-1312. 2001.
- 60-Petersen, K. F.; e colaboradores. Impaired Mitochondrial Activity in the Insulin-Resistant Offspring of Patients with Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*. Vol. 350. p. 664-671. 2004.
- 61-Poy, M.; e colaboradores. N. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. Vol. 432. p. 226-230. 2004.
- 62-Puigserver, P.; Spiegelman, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews*. Vol. 24. p. 78-90. 2003.
- 63-Randle, P. J.; e colaboradores. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet I*. Vol. 13. p. 785-789. 1963.
- 64-Rezende, E. A.; e colaboradores. Causas múltiplas de morte por doenças crônico-degenerativas: uma análise multidimensional. *Caderno de Saúde Pública*. Vol. 20. p. 1223-1231. 2004.
- 65-Rodriguez, A.; e colaboradores. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*. Vol.14. p. 1902-1910. 2004.
- 66-Ryder, J. W.; e colaboradores. Skeletal muscle reprogramming by activation of calcineurin improves insulin action on metabolic pathways. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 278. p. 44298-44303. 2003.
- 67-Sabin, M. A.; e colaboradores. Fatty acid-induced defects in insulin signalling, in myotubes derived from children, are related to ceramide production from palmitate rather than the accumulation of intramyocellular lipid. *Journal of Cellular Physiology*. Vol. 211. p. 244-252. 2007.

68-Safdar, A.; e colaboradores. Endurance exercise rescues progeroid aging and induces systemic mitochondrial rejuvenation in mtDNA mutator mice. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 108. p. 4135-4140. 2011.

69-Savage, D. B.; e colaboradores. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiological Review*. Vol. 87. p. 507-520. 2007.

70-Scandalios, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Vol. 38. p. 995-1014. 2005.

71-Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. Vol. 82. p. 291-295. 1997.

72-Silva, C. A.; Lima, W. C. Efeito benéfico do exercício físico no controle metabólico do diabetes mellitus tipo 2 a curto prazo. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. Vol. 46. p. 550-556. 2002.

73-Silveira, L. R.; e colaboradores. Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. *Journal of Cellular Physiology*. Vol. 217. p. 1-12. 2008.

74-Silveira, L. R.; e colaboradores. Effect of Lipid Infusion on Metabolism and Force of rat skeletal muscles during intense contractions. *Cellular of Physiology and Biochemistry*. Vol. 20. p. 213-226. 2007.

75-Silveira, L. R.; e colaboradores. Effect of lipid infusion on metabolism and force of rat skeletal muscles during intense contractions. *Cellular of Physiology and Biochemistry*. Vol. 20. p. 213-226. 2007.

76-Silveira, L. R.; e colaboradores. The contraction induced increase in gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma coactivator 1 α (PGC-1 α), mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) and hexokinase II (HKII) in primary rat skeletal muscle cells is dependent on reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1763. p. 969-976. 2006.

77-Tanaka, T.; e colaboradores. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ induces fatty acid β -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 100. p. 15924-15929. 2003.

78-Tang, X.; e colaboradores. Role of microRNAs in diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1779. p. 697-701. 2008.

79-Van Loon, L. J.; Goodpaster, B. H. Increased intramuscular lipid storage in the insulin-resistant and endurance-trained state. *Pflügers Archiv*. Vol. 451. p. 606-616. 2006.

80-Wahid, F.; e colaboradores. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1803. p. 1231-1243. 2010.

81-Wang, Y. X.; e colaboradores. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR δ . *PLoS Biology*. Vol. 2. p. e294. 2004.

82-Wheeler, G.; e colaboradores. In situ detection of animal and plant microRNAs. *DNA and Cell Biology*. Vol. 26. p. 251-255. 2007.

83-Zeng, Y.; e colaboradores. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Molecular Cell*. Vol. 9. p. 1327-1333. 2002.

Recebido para publicação em 25/07/2012
 Aceito em 07/09/2012