

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

HYGOR NUNES ARAUJO

CONTROLE MOLECULAR DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL PELO miRNA *Let-7b-5p*.

CAMPINAS

2019

HYGOR NUNES ARAUJO

CONTROLE MOLECULAR DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL PELO miRNA *Let-7b-5p*.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO HYGOR NUNES ARAUJO, ORIENTADA PELO PROFESSOR LEONARDO DOS REIS SILVEIRA E CO-ORIENTADA PELO PROFESSOR MURILO VIEIRA GERALDO.

Orientador: PROF^a DR. LEONARDO DOS REIS SILVEIRA Co-Orientador: PROF^a DR. MURILO VIEIRA GERALDO

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca do Instituto de Biologia Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Araujo, Hygor Nunes, 1988-Controle molecular da função mitocondrial pelo miRNA let-7b-5p / Hygor Nunes Araujo. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.
Orientador: Leonardo dos Reis Silveira. Coorientador: Murilo Vieira Geraldo. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
1. MicroRNAs. 2. Mitocôndria. 3. Let-7. 4. Gene lin28a. 5. PPAR beta. I. Silveira, Leonardo dos Reis, 1970-. II. Geraldo, Murilo Vieira, 1979-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Molecular control of mitochondrial function by miRNA let-7b-5p Palavras-chave em inglês: **MicroRNAs** Mitochondria Let-7 Gene lin28a PPAR beta Área de concentração: Fisiologia Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular Banca examinadora: Leonardo dos Reis Silveira [Orientador] Alice Cristina Rodrigues Ricardo Aurino de Pinho **Emerielle Cristine Vanzela** Ana Carolina Migliorini Figueira Data de defesa: 30-08-2019 Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a) - ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0003-1553-2635

⁻ Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/5325136809800181

Campinas, 30 de Agosto de 2019

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira Profa. Dra. Alice Cristina Rodrigues Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho Profa. Dra. Emerielle Cristine Vanzela Profa. Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as vitórias e desafios da vida,

Agradeço aos meus pais, Levy Izolino de Araujo e Vanuta Nunes Magalhães de Araujo, pela vida, criação, educação, orações e, sobretudo, pelo amor incondicional dedicado a mim e a meus irmãos,

Agradeço aos meus irmãos, Hugo Nunes Araujo e Rebeca Nunes Araujo, por todo esforço, amor, compreensão que jamais deixaram de me oferecer,

Agradeço a minha esposa, Letícia Paifer Marques, pelo amor, carinho, paciência, dedicação, apoio, conselhos, mudanças, vitórias e alegrias que me proporcionou desde que nos conhecemos. Preciso também registrar o meu obrigado pelas preciosas correções nas contas, cálculos e ajuda com experimentos no doutorado,

Agradeço as amigas do laboratório antigo, Aline P. Jarrete, Amanda C.S. Sponton, Daniele M. Guizoni, Jamaira Victorio, por todo o apoio psicológico, por emprestarem reagentes quando faltava no meu laboratório e, ainda, por aumentarem a qualidade do meu tempo,

Agradeço a Rafaela Mariano da Silva Araújo, a melhor iniciação científica que vi passar pelo nosso grupo, pela ajuda e apoio em experimentos cruciais durante o doutorado,

Agradeço aos amigos e integrantes do grupo, Dimitrius S.P.S.F. Guimarães, André G. Oliveira, Bianca C. Favero-Santos, Tanes I. Lima, Carlos H. G. Sponton, pela ajuda nos experimentos, pelas conversas científicas, pelas conversas pessoais e, sobretudo, pelo carinho e torcida,

Agradeço ao meu orientador, Leonardo R. Silveira, pela oportunidade de acesso na pósgraduação, pela vaga em seu grupo de pesquisa, pela paciência e por todo o tempo dedicado no desenvolvimento deste trabalho,

Agradeço ao meu co-orientador Murilo V. Geraldo, pela ajuda nas análises de predição de interação do miRNA-mRNA, na construção dos plasmídeos utilizados nos experimentos repórter por ensaio de luciferase e na elaboração do manuscrito e artigo,

Agradeço ao Dr. Narkar Vihang pela experiência no exterior, através da oportunidade de trabalhar por 90 dias em seu laboratório em Houston/Texas,

Agradeço à responsável pela limpeza dos laboratórios, Carmen C.S. Gomes, pela dedicação, competência e compromisso em desempenhar a indispensável função de manter o ambiente limpo e organizado,

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de doutorado, processo CNPQ 151520/2015-1, ao Santander-DERI pela verba que custeou parte dos gastos durante meu estágio no exterior, edital 031/2018, e à FAPESP pelo financiamento do projeto, processo 2016/23008-5.

RESUMO

Através de um banco de dados público (MIRWALK) buscando a associação de microRNAs e alvos moleculares na biogênese mitocondrial. A análise bioinformática mostrou interação entre Let-7b-5p e a região 3'UTR de PGC1α. A interação física foi ainda confirmada pelo ensaio de luciferase em células musculares esqueléticas de camundongos primários, usando o mimic ou antimir de Let-7b-5p. De fato, demonstrou-se que a transfecção de células musculares esqueléticas de camundongos primários com Let-7b-5p diminui acentuadamente a expressão proteica de PGC1a. Esse efeito foi associado à redução da intensidade de fluorescência de mitotracker red, indicando um menor conteúdo mitocondrial em comparação ao controle. Além disso, 8 semanas de tratamento com exercício oxidativo (EO) ou dieta hiperlipídica (HFD) demonstraram afetar a expressão de Let-7b-5p. Enquanto o EO demonstrou diminuir a expressão de Let-7b-5p no músculo sóleo, HFD teve o efeito oposto, aumentando o Let-7b-5p. A expressão de PPAR β estava claramente relacionada a esses achados, demonstrando que as mitocôndrias são um regulador da expressão de Let-7b-5p no músculo esquelético. Para descobrir como a mitocôndria controla Let-7b-5p, voltamos à análise de bioinformática e observamos que o PPARB é amplamente enriquecido em toda a sequência de DNA de Lin28a, sugerindo que o PPAR^β tem um efeito importante sobre a transcrição de Lin28a. Curiosamente, a imagem do *footprint* no DNA mostrou pontos diferentes que se sobrepõem ao enriquecimento de PPAR β , indicando que a cromatina é mais aberta pela maquinaria transcricional. De fato, a exposição de células musculares primárias de camundongos a diferentes compostos que deveriam induzir a transativação de PPARB, incluindo GW501516, e AICAR demonstrou aumentar Lin28a. Este efeito foi ainda confirmado nas células C2C12. O PPAR^β também foi manipulado pela superexpressão de co-reguladores nucleares, incluindo NCOR1 e PGC1 α em células MEF. Enquanto PGC1α aumentou acentuadamente a expressão de Lin28a, observou-se que NCOR1 tinha o efeito oposto. Achados semelhantes também foram observados em células musculares primárias de camundongos. Além disso, nas células com superexpressão de PGC1 α , a expressão de Let-7b-5p foi reduzida. Para confirmar esses achados, no knockdown do PPARB, a expressão de Lin28a foi regulada negativamente e esse efeito foi muito consistente com o aumento da expressão de Let-7b-5p, aumentando a evidência de que o PPARß regula a expressão de Let-7b-5p por um mecanismo dependente de Lin28a. De fato, superexpressamos a PGC1a em células musculares esqueléticas de camundongos primários com inibidor químico de PPARB, GSK0660, e sob essa condição perdemos a expressão de Lin28a e PDK4, um alvo PPAR bem conhecido no músculo esquelético. Finalmente, também demonstramos em sóleo de animais após 8 semanas de EO, um efeito claramente associado à baixa expressão de Let-7b-5p, demonstrando que Let-7b-5p é regulado por PPARβ em um mecanismo dependente de Lin28a em célula muscular esquelética.

ABSTRACT

We went through public data base (MIRWALK) seeking for association of selected microRNAs and molecular targets for mitochondrial biogenesis. The bioinformatics analysis showed interaction between Let-7b-5p and 3'UTR of PGC1a. Physical interaction was further confirmed by luciferase assay in primary mice skeletal muscle cells using either mimic or antimir of Let-7b-5p. Indeed, transfection of primary mice skeletal muscle cells with Let-7b-5p was demonstrated to marked decrease the protein expression of PGC1 α . This effect was associated with low intensity of mitotracker red fluorescent light indicating a lower mitochondrial content as compared to control. In addition, 8 weeks of either oxidative exercise (AE) or high fatty diet (HFD) treatment were demonstrated to affect Let-7b-5p expression. While AE was demonstrated to decrease Let-7b-5p expression in soleus muscle, HFD had the opposite effect increasing Let-7b-5p. PPAR β expression was clearly related to these findings demonstrating that mitochondria is a regulator of *Let-7b-5p* expression in skeletal muscle. In order, to figure out how mitochondria controls Let-7b-5p we went back to bioinformatics analysis and observed that PPAR β is largely enriched throughout Lin28a DNA sequence suggesting that PPAR β has an important effect over Lin28a transactivation. Interestingly, DNAse footprint showed different points overlapping with PPAR β enrichment indicating that the cromatin is more opened by transcriptional machinery. In fact, exposure of primary mice skeletal muscle cells to different compounds supposed to induce PPAR β transactivation including GW501516, and AICAR was demonstrated to increase Lin28a. This effect was further confirmed in C2C12 cells. PPARB was also manipulated by overexpression of nuclear co-regulators including NCOR1 and PGC1 α in MEF cells. While PGC1a markedly increased Lin28a expression, NCOR1 was observed to have the opposite effect. Similar findings were also observed in primary mice skeletal muscle cells. Moreover, in PGC1 α overexpressing cells the Let-7b-5p expression was reduced. To confirm these findings we knockeddown PPAR β , Lin28a expression was downregulated and this effect was very consistent with increased Let-7b-5p expression increasing the evidence that PPAR β regulates Let-7b-5p expression by a Lin28a-dependent mechanism. Indeed, we overexpressed PGC1 α in primary mice skeletal muscle cells with chemical PPAR β inhibitor, GSK0660, and under such condition we lost the expression of Lin28a and PDK4, a well known PPAR target in skeletal muscle. Finally, we also demonstrated in soleus muscle in animals after 8 weeks of AE, an effect that was clearly associated with low Let-7b-5p expression demonstrating that Let-7b-5p is regulated by PPAR β in a Lin28a-dependent mechanism in skeletal muscle cell.

LISTA DE FIGURAS

| Figura 1. Esquema gráfico da biogênese, maturação, transporte e função do miRNA 16 |
|---|
| Figura 2. Hipótese do trabalho |
| Figura 3. Esquema de reações enzimáticas realizadas para detecção dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico |
| Figura 4. Genes preditos como alvos de <i>Let-7b-5p</i> |
| Figura 5. Ensaio de luciferase utilizando uma construção contendo PGC1α e PGC1β na presença de <i>mimic</i> ou inibidor de <i>Let-7b-5p</i> |
| Figura 6. miRNA Let-7b-5p reduz expressão de PGC1α em células |
| Figura 7. Exercício físico reduz Let-7b-5p em músculo de animais |
| Figura 8. Expressão gênica de Lin28a e PDK4 em resposta a miméticos de exercício físico em células primárias |
| Figura 9. Miméticos de exercício físico aumentam o conteúdo proteico de Lin28a em células primárias |
| Figura 10. PPARβ está enriquecido na região promotora de Lin28a em C2C12 |
| Figura 11. Antagonista de PPARβ reduz a expressão de Lin28a em células primárias |
| Figura 12. Superexpressão de PGC1α aumenta a expressão de Lin28a e reduz <i>Let-7b-5p</i> em células primárias |
| Figura 13. Antagonista de PPARβ impede o aumento na expressão de Lin28a mesmo superexpressando PGC1α em células primárias |
| Figura 14. <i>Knockdown</i> de PPARβ por siRNA reduz a expressão de Lin28a aumentando <i>Let-7b-</i> 5 <i>p</i> 42 |
| Figura 15. Exercício físico aumenta a expressão de PPARβ e LIN28a em músculo de camundongos |
| Figura 16. Sumário Gráfico 48 |
| Figura 17. Suplementar 01. <i>Let-7b-5p</i> altera a concentração dos intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico e de lactato |
| Figura 18. Suplementar 02. Tratamento com ácido palmítico não altera expressão de <i>Let-7b-5p</i> em C2C12 |
| Figura 19. Suplementar 03. Expressão gênica de Lin28a em resposta a miméticos de exercício físico em C2C12 |
| Figura 20. Suplementar 04. Co-repressor ou co-ativador de PPARβ modulam a expressão de LIN28a |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- $\mu M-Micromolar$
- 3'-UTR Região 3' não traduzida
- Akt Proteina quinase B
- AMPk Proteína quinase ativada por AMP
- ATCC Coleção de tipo de cultura celular americana
- ATPsyn β ATP sintase beta
- CAAE Certificado de apresentação para apreciação ética
- cDNA Ácido dexoribonucleico complementar
- COX1 Subunidade 1 de citocromo C oxidase (COX 1)
- DNA Ácido dexoribonucleico
- EPM Erro padrão da média
- ERR receptor relacionado a estrógeno
- FBS Soro fetal bovino
- FM Meio de fusão
- g-Grama
- HS Soro de cavalo
- IGF1R Receptor de fator de crescimento igual insulina 1
- IL-1 β Interleucina 1 beta
- IL-6 Interleucina 6
- IL-8 Interleucina 8
- INSR Receptor de insulina
- IRS2 Substrato receptor de insulina tipo 2
- kg Quilograma
- mg Miligrama
- miRNAs microRNAs
- mL Mililitro

mM-Milimolar

- mRNA Ácido ribonucleico mensageiro
- NADH Dinucleótido de nicotinamida e adenina
- NCOR1 Co-repressor nuclear 1
- ND1 Subunidade 1 de NADH desidrogenase (ND1)
- nm Nanometro
- nM-Nanomolar
- NRF fator respiratório nuclear

NUDFS1 – Subunidade 1 de NADH:ubiquinona oxidoreductase

- PBS Tampão fosfato salina
- PGC1 α co-ativador 1- α do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama-1
- PGM Meio de crescimento
- PI3K Fosfoin Quinase 3
- PPAR receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama-1
- $PPAR\beta$ receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama-1beta
- RNA Ácido ribonucleico

siPPAR β – Pequeno RNA de interferência de receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama-1beta

- SIRT1 Desacetilase dependente de NAD sirtuina-1
- TCLE Termo de consentimento livre e esclarecido
- TFAM Fator de transcrição mitocondrial
- $TNF-\alpha$ Fator de necrose tumoral alfa
- UCP Proteína desacopladora

SUMÁRIO

| 1. IN7 | ſRODUÇÃO | 13 |
|--------|--|----|
| 2. HII | PÓTESE | 21 |
| 4.1. | Aspectos éticos | 23 |
| 4.2. | Protocolo de treinamento em animais | 23 |
| 4.3. | Experimentos In vitro | 23 |
| 4.3.1. | Cultura primária de células musculares | 23 |
| 4.3.2. | Cultura de células C2C12 | 24 |
| 4.3.3. | Cultura de células MEF | 24 |
| 4.3.4. | Cultura de células HEK293T | 25 |
| 4.3.5. | Transfecção de scramble, <i>mimic</i> e inibidor de <i>Let-7b-5p</i> | 25 |
| 4.3.6. | Validação da interação do <i>Let-7b-5p</i> e da região 3'UTR PGC1α | 25 |
| 4.3.7. | Tratamento de ativador de AMPk, agonista e antagonista de PPAR | 26 |
| 4.3.8. | Transfecção de plasmídeo pCDNA, PGC1α e NCOR1 | 27 |
| 4.4. | Extração de RNA total | 27 |
| 4.5. | Reação de transcrição reversa | 27 |
| 4.6. | Reação de PCR em tempo real | 27 |
| 4.7. | Lista de primers para reação de PCR em tempo real | 28 |
| 4.8. | Análise da expressão de miRNA | 28 |
| 4.9. | Western Blotting | 28 |
| 4.10. | Intermediários do ciclo do ácido tricarboxilico (ICAT) | 29 |
| 4.11. | Indução de inflamação com ácido graxo saturado | 30 |
| 4.12. | Conteúdo mitocondrial | |
| 4.13. | Análise estatística | |
| 3. RE | SULTADOS | 32 |
| 4. DIS | SCUSSÃO | 44 |
| 5. CO | NCLUSÃO | 48 |
| 6. AN | EXO I. Figuras suplementares | 61 |
| 7. AN | EXO II. Comissão Ètica no Uso de Animais | 64 |
| 8. AN | EXO IV. Direito autoral | 65 |
| | | |

1. INTRODUÇÃO

As mitocôndrias são responsáveis pela síntese de ATP através do metabolismo de nutrientes e consomem, durante o processo de fosforilação oxidativa, entre 90 e 95% do oxigênio celular. Além disso, em homeostasia, as mitocôndrias também geram calor e produzem espécies reativas de oxigênio (EROS) (ROCHA et. al., 2013). A homeostase mitocondrial é constantemente desafiada dependendo da necessidade energética celular, como por exemplo, sobrecarga de nutrientes, jejum ou exercício físico (CARTONI et. al., 2005). Para atender a demanda energética, proteínas consideradas sensores metabólicos (AMPk e Sirt-1), podem contribuir para aumento na função mitocondrial e/ou, ativação de vias para formação de novas mitocôndrias, processo conhecido como biogênese mitocondrial (HARDIE, ROSS e HAWLEY, 2012; LIESA e SHIRIHAI, 2013). Neste processo, há ativação de vias de sinalização que promovem transcrições de genes nucleares e mitocondriais (SCARPULLA, 2008). Majoritariamente, os genes mitocondriais são codificados pelo DNA genômico. Ao passo que, pelo menos outros 13 genes codificantes de proteínas das subunidades da cadeia de transporte de elétrons são codificados pelo DNA mitocondrial (SCARPULLA, 2008). Embora tenhamos diferentes alças de ativação desse processo, as proteínas AMPk e Sirt-1 desempenham um papel fundamental na ativação da via de sinalização de biogênese mitocondrial. A fosforilação em Thr172 na subunidade α de AMPk, em resposta à redução da concentração de ATP e aumento da formação de AMP, promove a fosforilação de PGC1α em Thr1722 e Ser538 aumentando sua atividade (JAGER et. al, 2007; O'NEILL, HOLLOWAY e STEINBERG, 2013). Além disso, o aumento da razão NAD⁺/NADH ativa Sirt-1 que, por sua vez, desacetila PGC1α, contribuindo também para aumento de sua atividade (LIESA e SHIRIHAI, 2013). Descrito por Puigserver e colaboradores (1998), o PGC1a é considerado chave no controle da biogênese e dinâmica mitocondrial (GILL et. al., 2019; MOUCHIROUD et. al., 2014). Capaz de interagir e de ativar famílias de receptores nucleares como receptor relacionado a estrógeno (ERR) e receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR), a molécula PGC1a regula, no DNA genômico, a transcrição do fator respiratório nuclear (NRF1), fundamental na biogênese mitocondrial (FAN, et. al., 2015; NARKAR et. al., 2011; SCARPULLA, 2012). Posteriormente, NRF1, PPAR e PGC1a formam complexos transcricionais e iniciam a transcrição genômica de genes de complexos mitocondriais como ATP sintase beta (ATPsynβ), subunidade 1 de NADH:ubiquinona oxidoreductase (NUDFS1), proteína desacopladora (UCP) e, ainda, o fator de transcrição mitocondrial (TFAM). Por sua vez, TFAM, diretamente no DNA mitocondrial, transcreve os genes da subunidade 1 de NADH desidrogenase (ND1) e subunidade 1 da citocromo c oxidase (COX1) (SCHOLPA E SCHNELLMANN, 2017).

Entretanto, o desequilíbrio da homeostase celular, causados, por exemplo, pela sobrecarga crônica de nutrientes, desencadeiam perda ou piora da função mitocondrial. Estudos mostram que o aumento intracelular de lipídios e inflamação, levam à redução da atividade mitocondrial e ao aumento da produção de EROs (SAVAGE et. al., 2007; KOVES et. al., 2008; MUOIO et. al., 2008). Entre as principais características da disfunção mitocondrial estão aumento no potencial de membrana mitocondrial, redução do consumo de oxigênio, excessiva produção de EROS e redução na produção de ATP (BREHAM et. al., 2006; ELDOR et. al., 2017). Barbosa e colaboradores (2013) demonstraram uma relação forte entre resistência à insulina, produção de EROS e disfunção mitocondrial. Neste trabalho, foi observado que ativação de Akt impacta diretamente a indução de PGC1a. Os autores mostraram que células tratadas com ácido palmítico apresentaram redução na fosforilação de Akt, na capacidade respiratória e na transcrição do PGC1a. Por outro lado, a redução na produção de EROs, resultou em aumento na captação de glicose, na expressão de PGC1a e no consumo de oxigênio mitocondrial. A redução de PGC1 α nas células resistentes a insulina, parece ser consequência de uma atenuação na indução de CREB, um fator de transcrição que regula PGC1a (FERNANDEZ-MARCOS e AUWERX, 2011; KANG et. al., 2017). A obesidade também pode regular genes envolvidos na via de biogênese e função mitocondrial. Um estudo recente mostrou que ratos machos obesos, induzidos por dieta hiperlipídica, apresentaram redução na expressão gênica e no conteúdo proteico de PGC1a no tecido adiposo branco inguinal e no tecido adiposo marrom intraescapular (WANG et. al., 2019). Valerio e colaboradores (2006) observaram em camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica, redução no conteúdo de DNA mitocondrial, na expressão gênica de PGC1a, NRF1 e TFAM, além de redução no conteúdo proteico de citocromo c e no complexo 4 da cadeia de transporte de elétrons, resultando em redução no consumo de oxigênio no tecido adiposo epididimal. Em outro estudo, os autores observaram em camundongos uma redução na expressão dos genes PGC1a, PCG1ß e das subunidades 1 e 4 da cadeia de transporte de elétrons seguidos de redução no conteúdo proteico de citocromo c e PGC-1a no músculo gastrocnêmio após alimentação rica em lipídios por 21 dias (SPARKS et. al., 2005). Ainda neste estudo, os autores observaram redução na expressão de PGC1a, PCG1ß e genes que codificam as subunidades 1, 2, 3 e 4 da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial no músculo vasto lateral em humanos alimentados por três dias com dieta hiperlipídica. Fortalecendo estes achados, outro estudo recente mostrou que em humanos obesos, houve redução no conteúdo proteico das subunidades 1, 3 e 5 da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (KRAS et. al., 2018). Corroborando estes achados, Potes et. al., (2019) observaram que idosos com sobrepeso apresentaram redução na produção de ATP, além de redução na expressão proteica das subunidades 1, 3, 4 e 5 da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial no músculo asto lateral. Enquanto obesidade e sobrepeso reduzem a função mitocondrial, a diminuição de peso corporal por restrição calórica, exercício ou cirurgia bariátrica é capaz de aumentar a expressão de PGC1 α e TFAM, além de melhorar a função mitocondrial e a atividade de citrato sintase em músculo vasto lateral de humanos (CIVITARESE et. al., 2007; COEN et. al., 2015). Por estar fortemente associada ao desenvolvimento ou à evolução de doenças metabólicas, como diabetes do tipo 2 e obesidade, o combate à disfunção mitocondrial tem sido cada vez mais explorado como potencial terapêutico (BROWNLLE, 2005; ASHRAFIAN et. al., 2007; HERNANDEZ-MIJARES et. al., 2011).

Nas últimas décadas, com a descoberta dos microRNAS (miRNAs) e sua função na regulação pós transcricional de genes, houve avanço extraordinário na compreensão do controle e sinalização em diversos processos celulares. MicroRNAS são pequenos RNAs endógenos (21-22 nucleotídeos) não-codificantes. Transcritos no núcleo, os miRNAs permanecem em estruturas de *steam loop* até serem processados por *Dicer* e *Drosha* para alcançarem seu estado maduro e exercerem sua função de controlar a expressão gênica através da ligação em sítios da região 3'UTR de RNAs mensageiros e reprimir a tradução ou degradação de RNAs mensageiros (BARTEL, 2004; AMBROS, 2004) (Figura 1).



Figura 1. Esquema gráfico da biogênese, maturação, transporte e função do miRNA. Após transcrição e o completo processo de maturação, o miRNA pode ser estabilizado pelo complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), interagir com o mRNA alvo e impedir o processo de tradução. Além disso, os miRNAs maduros podem atuar em outras células através dos exossomos ou ligado nas proteínas argonautas (AGO) ou em lipoproteínas de alta densidade (HDL). Figura adaptada de Lima e colaboradores, 2016.

Muitos estudos têm mostrado a regulação da expressão gênica por miRNA em diferentes processos celulares (HUANG et. al., 2010). Na oncogênese, o miR-29a pode regular crescimento, migração e apoptose. Yang e colaboradores (2019) mostraram que o miR-29a tem como alvo PDGFC e PDGFA. A superexpressão do miR-29a reduz a ativação da via PDGF, importante para crescimento tumoral, resultando na inibição do crescimento, indução de apoptose em glioblastoma e células tronco de glioblastoma. Além disso, em células tronco de glioblastoma, observou-se redução na migração e invasão. Os miRNAs também podem afetar a diferenciação celular. Em seu estudo, Ge e colaboradores (2019) observaram que em células C2C12, o aumento nos níveis do miR-10b-5p acarretou prejuízo na diferenciação em miotubos. Os autores mostraram que o miR-10b-5p tem como alvo direto NFAT5 (fator nuclear 5 ativado por células T), um regulador chave na migração e diferenciação de mioblastos (O'CONNOR et. al., 2007). Além do crescimento, migração e diferenciação, os miRNAs também estão envolvidos no controle de outro processo fundamental para homeostasia celular, o metabolismo de glicose. Em um estudo recente, Zhang e colaboradores (2018) mostraram que o miR-125-3p tem como alvo Akt. Os autores mostraram que aumento nos níveis deste miRNA resulta em redução no conteúdo proteico da Akt, enquanto que o bloqueio utilizando um inibidor do miR-125-3p promoveu aumento na expressão da Akt em células C2C12. Em outro estudo, Honardoost e colaboradores (2016) mostraram que miR-135 controla o metabolismo de glicose, por ter como alvo INSR. Neste estudo, células C2C12 transfectadas com miR-135 apresentaram redução no conteúdo proteico de INSR e, consequentemente, diminuição da captação de glicose.

O processo de biogênese mitocondrial também pode ser regulado pelos miRNAs. Diferentes miRNAs podem controlar a expressão dos genes que codificam as proteínas AMPk, Sirt-1 e PGC1a, fundamentais na biogênese e função mitocondrial (LIMA et. al., 2016). Estudos mostraram que a família do miR-33 controla a expressão de AMPk, proteína responsável por fosforilar e ativar PGC1a (DAVALOS et. al., 2011, JÄRGER et. al., 2007). Além de AMPk, a proteína Sirt-1 também ativa PGC1a. Sirt-1 remove o radical acetil e aumenta a atividade de PGC1a (NEMOTO et. al., 2005). Soriano-Arroquia e colaboradores (2016) observaram que durante o envelhecimento a expressão de Sirt1 é inversamente correlacionada aos níveis do miR-181-a no músculo esquelético de camundongo. Após análise de bioinformática, os autores mostraram que a região 3'UTR de Sirt-1 possui sítio de interação com o miR-181-a. Por ensaio repórter, os autores mostraram que a superexpressão do miR-181-a reduziu a intensidade de fluorescência do GFP em plasmídeo fusionado com a região 3'UTR de Sirt1. No entanto, ao utilizar um plasmídeo com a região de interação 3'UTR mutada, não foram observadas mudanças na intensidade de fluorescência do GFP após superexpressão do miR-181-a. Além disso, em células da linhagem C2C12 a superexpressão do miR-181-a promoveu redução de Sirt-1, evidenciando que este miRNA pode controlar diretamente a expressão de Sirt-1 em células musculares. Também em células C2C12, Xu e colabores (2015) mostraram que a superexpressão do miR-761 reduziu o conteúdo de DNA mitocondrial e a intensidade de fluorescência de Mitotracker. Em busca de resposta para este fenótipo, os autores procuraram por genes alvo do miR-761 envolvidos no controle de biogênese mitocondrial. Após análise de bioinformática, foi observado que o miR-761 tem como alvo PGC1a. A interação física miRNA/mRNA foi mostrada por ensaio repórter utilizando um plasmídeo com luciferase fusionada a 3'UTR de PGC1a contendo ou não mutação na região de interação do miR-761. Para analisar o efeito fisiológico deste miR no controle de PGC1a, células C2C12 foram transfectadas com mimic do miR-761. Após transfecção, foi observada redução no conteúdo proteico de PGC1a. Portanto, os autores concluíram que o miR-761 afeta biogênese de mitocôndrias por regular diretamente PGC1a. Além de regular diretamente genes chaves no processo de biogênese de mitocôndrias, Shen e colaboradores (2016) ainda mostraram que os miRNAs também atuam na regulação dos fatores de transcrição destes genes. Neste estudo, os autores mostraram que miR-27b tem como alvo direto o fator de transcrição Foxj3. Em C2C12, os autores observaram que a superexpressão de miR-27b promoveu redução de Foxj3 e de seus genes *downstream* incluindo Mef2c, PGC1 α , NRF1 e TFAM. Recentemente, Wang e colaboradores (2019) mostraram que o miR-204-5p regula diretamente o PGC1 α e Sirt1. Neste estudo foi observado, em tecido adiposo marrom subescapular da prole de camundongos obesos, aumento na expressão do miR-204-5p, seguido de redução na expressão dos genes e do conteúdo proteico de PGC1 α e PPAR α . Além disso, o conteúdo de DNA mitocondrial e de genes que codificam subunidades da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial ATP5a, NDUFS8 também foram reduzidos.

Entre as várias famílias de miRNAs, a família de Let-7 possui um papel de destaque na regulação de diversas funções biológicas, dentre elas, envelhecimento, proliferação, motilidade, apoptose, metabolismo, função e dinâmica mitocondrial (DRUMMOND et. al., 2011; ZHENG et. al., 2019; XU et. al., 2014; KUPPUSAMY et. al., 2015; FROST e OLSON, 2011; HU et. al., 2018). A família Let-7 possui 12 membros altamente conservados entre as espécies (BALZEAU et. al., 2017; ROUSH e SLACK, 2008), incluindo o Let-7b-5p. A regulação na expressão da família Let-7 pode melhorar ou piorar o fenótipo, dependendo do contexto e do tipo celular. No câncer, a família Let-7 é bem conhecida pelo papel antioncogênico (JOHNSON et. al., 2007; BIAMONTE et. al., 2019). Em câncer de pulmão e de mama, a inbição de membros da família Let-7 promoveu aumento na expressão de HMGA2, K-Ras e c-Myc, genes pró-oncogênicos alvos destes miRNAS (JOHNSON et. al., 2005; MAYR, HEMANN e BARTEL, 2007). Em células de câncer hepático, a superexpressão de Let-7b diminui a proliferação, a invasão e a migração, via redução da expressão FZD4 e consequente repressão da via da Wnt/βcatenina (CAI et. al., 2017). Além disso, o Let-7b também desempenha um papel fundamental no sistema imunológico. Em macrófagos, a superexpressão de inibidor do Let-7b promoveu aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-α, IL-1β, IL-6, e IL-8 (NEMATIAN et.al., 2018). Por outro lado, em células neuronais, a elevada expressão de Let-7b-5p foi associada a neurodegeneração, indução da produção de citocinas e redução na expressão de genes que expressam proteínas da via de sinalização à insulina. Em estudo com camundongos, após a aplicação de Let-7b no canal raquidiano, foi observado aumento nos níveis de Toll-Like Receptor 7, desencadeando neurodegeneração (LEHMANN et.al., 2012). No contexto metabólico, a família Let-7 tem como alvo genes envolvidos na sensibilidade à insulina, como IGF1R, INSR, IRS2. Sendo assim, a superexpressão deste miRNA em camundongos resultou em resistência à insulina (ZHU et. al., 2011). De fato, em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina, a redução de Let-7 favorece a proliferação e aumenta a sobrevivência da célula através da melhora da sinalização na via de PI3K-Akt (SUNG et. al., 2019). Frost e Olson (2011) demonstraram que animais superexpressando o Let-7b exibiram maior intolerância a glicose e reduzida secreção de insulina. Esses efeitos foram acompanhados de menor massa corporal, sugerindo aumento na taxa de proteólise celular. Embora o mecanismo ainda não seja totalmente conhecido, esses efeitos foram, pelo menos em parte, mediados pela inibição da via da insulina IRS/Akt no tecido muscular e hepático, sugerindo que a manipulação desses alvos (IRS/Akt) pode constituir-se de uma estratégia terapêutica importante para o controle da resistência à insulina no tecido muscular. Mais interessante, o bloqueio na atividade do Let-7b com o uso do antimir de Let-7b foi suficiente para reverter os efeitos da superexpressão desse miRNA na intolerância a glicose. Em adição, foi mostrado em ratos Wistar que, a inibição da expressão do Let-7 promoveu aumento na expressão de IGF1R no músculo tibial anterior (ZHANG et. al., 2017). Juntos, estes estudos mostraram que alterações nos níveis de Let-7b-5p promovem diferentes fenótipos celulares e teciduais, evidenciando que o aumento ou a completa inibição da função dos miRNAs resultam em mudanças na homeostase fisiológica intracelular (BARTEL, 2018). Sendo assim, os níveis de miRNAs necessitam de equilíbrio, caso contrário podem desencadear um ambiente desfuncional em células em cultivo, tanto de camundanodos quanto de humanos.

Para a família *Let-7*, as proteínas Lin28a e Lin28b são as principais responsáveis por manter, a nivel pós-trancricional, o equilíbrio na expressão deste miRNAs (PISKOUNOVA et.al., 2011; VISWANATHAN et. al., 2008). Conhecidas como proteínas ligantes de RNA, Lin28a e Lin28b possuem dois domínios ligantes de RNA, conhecidos como *cold shock domain* (CSD) e *CCCH-type zinc finger*, capazes de reconhecer e ligarem-se à região terminal do *loop* do *pré-Let7*, reprimindo o processo de maturação (PISKOUNOVA et.al., 2011; VISWANATHAN et. al., 2008; HEO, et. al., 2008; HEO, et. al., 2009; FARZANEH et. al., 2017). Dependendo do contexto, o aumento na expressão de Lin28a/b pode ter um efeito negativo no fenótipo. Por bloquear o processo de maturação dos membros da família *Let-7*, Lin28 possui uma característica pró-oncogênica (BALZEAU et. al., 2017). Em células de câncer de mama, após o bloqueio de Lin28 por RKIP, foi observado aumento na expressão de *Let-7* e redução no processo de invasão celular e metástase (DANGI-GARIMELLA el. al., 2009). Viswanathan e colaboradores (2009) mostraram aumento na expressão Lin28 em hepatocarninoma de humanos enquanto a expressão de todos os membros da família *Let-7* foi reduzida. Os autores mostraram ainda, que células tumorais com baixa expressão de Lin28

apresentaram menor incidência e recorrência precoce quando comparada a tumores com maior expressão de Lin28. Além disso, em células K562, o knockdown de Lin28 por shRNA promoveu aumento na expressão de três membros da família Let-7: Let-7b, Let-7b e miR-98. O aumento dos níveis destes miRNAs causou prejuízo no crescimento celular. Os autores justificam este fenótipo após demonstrarem redução na expressão de c-MYC e Kras, genes alvo da família Let-7. Dentro do contexto metabólico, a expressão de Lin28a está relacionada com a melhora no fenótipo celular. Zhu e colaboradores (2011) mostraram que a superexpressão de Lin28a/b altera o metabolismo de glicose. Os autores geraram camundongos transgênicos para a proteína Lin28. Estes animais apresentaram redução da massa de tecido adiposo e aumento de tecido livre de gordura, além de atenuar o ganho de peso promovido pela dieta hiperlipídica. Os animais transgênicos apresentaram ainda, melhora na sensibilidade a insulina e redução nos níveis de Let-7a, Let-7b e Let-7g no fígado e no músculo esquelético. Em outro estudo, foi observado que em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina, a superexpressão de Lin28 favorece a proliferação e o aumento da sobrevivência de células através da melhora da sinalização na via de PI3K-Akt (SUNG et. al., 2019). A superexpressão de Lin28 também pode afetar a diferenciação do músculo esquelético. Polesskaya e colaboradores (2007) mostraram que durante a fase de proliferação a expressão de Lin28 é baixa, porém, há aumento acentuado na expressão de Lin28 durante a diferenciação de mioblastos extraídos de músculo esquelético de camundongos. Em experimentos de ganho e perda de função, os autores observaram que enquanto a superexpressão de Lin28 aumenta a eficiência de diferenciação, a redução na expressão de Lin28 inibe esse efeito em mioblastos. Shyh-Chang e colaboradores (2013) apresentaram evidências de que o aumento na expressão da proteína Lin28a inibiu a expressão do Let-7b, favorecendo o reparo tecidual, o crescimento capilar e cartilaginoso em camundongos transgênicos. Além disso, a expressão de Lin28a favoreceu a indução de genes oxidativos incluindo as enzimas do ciclo de Krebs, como o citrato sintase e isocitrato desidrogenase, sugerindo que essa proteína exerce efeitos no reparo tecidual e na indução da síntese proteica, pelo menos em parte, via aumento da produção de energia oxidativa. Juntos, estes trabalhos mostram que Lin28 desempenha um papel importante no metabolismo e na diferenciação celular através da regulação da familia Let-7. Embora estudos anteriores tenham demonstrado o papel do Let-7b em diferentes processos celulares, seu efeito sobre o mecanismo molecular de biogênese/função mitocondrial ainda é desconhecido. Dada a importância dos miRNAs na regulação da expressão gênica e seu potencial terapêutico reconhecido no câncer e doenças metabólicas (ALMEIDA et.al., 2011), o objetivo do trabalho foi avaliar a função de *Let-7b-5p* no processo de biogênese e função mitocondrial, bem como, o mecanismo de controle de seus níveis.

2. HIPÓTESE

Devido a relação já bem estabelecida entre o miRNA *Let-7*, resistência à insulina e disfunção mitocondrial, nossa hipótese é que o *Let-7b-5p* possa interagir com o processo de biogênese e função mitocondrial via PGC1 α , importante reguladore destes processos no tecido muscular. Além disso, acreditamos que PPAR β , um fator de transcrição regulado pelo PGC1 α , possa regular a expressão deste miRNA. Caso nossa hipótese seja verdadeira, o eixo PPAR β /*Let-7b-5p* poderá constituir-se de um alvo terapêutico no combate a disfunção mitocondrial.



Figura 2. Hipótese do trabalho. O miRNA *Let-7b-5p* impede o processo tradução do RNA mensageiro de PGC1 α , afetando diretamente a via de sinalização de biogênese e função mitocondrial.

OBJETIVOS

Geral: Avaliar o papel do miRNA *Let-7b-5p* na via de sinalização do processo de biogênese e função mitocondrial.

Específicos:

- a) Validar a interação do miRNA *Let-7b-5p* com PGC1α por Luciferase.
- b) Avaliar a expressão de PGC1α e mensurar por fluorescência da sonda *mitotracker*, a densidade mitocondrial em células primárias controle, transfectadas com *Let-7b-5p* e antimir.
- c) Quantificar intermediários de ciclo de Krebs em células controle, transfectadas com *Let-7b-5p* e antimir.
- d) Tratar células primárias com fármacos agonistas (Gw501516) e antagonista (GSK0660) de PPARβ e analisar expressão de Lin28a.
- e) Ativar PPARβ através da transfecção de PGC1α em células primárias na ausência e presença de antagonista de PPAR (Gsk0660) e analisar a expressão de Lin28.
- f) Analisar da expressão de *Let-7b-5p* em células primárias transfectadas com PGC1a.
- g) Analisar da expressão de *Let-7b-5p* em células primárias transfectadas com siPPARβ.
- h) Quantificar a expressão de *Let-7b-5p*, Lin28a e PPAR β em animais fisicamente treinados.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

Os experimentos realizados neste projeto utilizando animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais - Instituto de Biologia – Unicamp, sob o registro n.º 4694-1/2017. Todos os animais são oriundos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica - Universidade Estadual de Campinas (CEMIB-Unicamp).

4.2. Protocolo de treinamento em animais

Camundongos C57BL/6Junib machos com 4 semanas de idade foram mantidos em gaiolas (4 animais/gaiola), à 21 ± 1°C em ciclo claro/escuro de 12 horas. Durante todo o protocolo, os animais tiveram acesso livre à água, dieta padrão (Nuvilab-CR1, Brazil) ou dieta hiperlipídica (Prag Solution, Brazil). O animais foram separados em três grupos: controle tratado com dieta padrão (Ct), treinado tratado com dieta padrão (Tr), controle tratado com dieta hiperlipidica (Hfd). Antes do início do treinamento físico, todos os animais foram submetidos a adpatação em esteira por 5 dias, à velocidade de 8 cm/s, durante 10 min para realização o teste de velocidade máxima. Após a adptação, todos os animais realizaram o teste de velocidade máxima para determinação da intensidade do treinamento físico (PAULA et. al., 2015; KURAUTI et. al., 2016). O teste foi iniciado com aquecimento de 8 min, à velocidade de 15 cm/s. Ao término do aquecimento, a velocidade foi aumentada 5 cm/s a cada minuto, até a exaustão e desistência voluntária do animal. O protocolo de treinamento físico foi realizado no início da manhã, apenas pelo grupo Tr (controle tratado com dieta padrão) com duração de 1 h por dia, 5 dias por semana, durante 8 semanas, em esteira inclinada a 25° e velocidade correspondente à 70% da velocidade maxima obtida no teste. Após as 8 semanas de treinamento físico aeróbio, os animais foram eutanasiados e os músculos sóleo coletados e estocados a -80°C para análises posteriores.

4.3. Experimentos In vitro

4.3.1. Cultura primária de células musculares

Camundongos C57BL/6Junib (28 dias) foram sacrificados após a administração intraperitoneal de quetamina (300 mg/kg), e xilazina (30 mg/kg). Todos os músculos das patas traseiras foram retirados rapidamente e incubados em PBS contendo glicose (1%) e penicilina (1%). Após completa retirada do tecido muscular, foi realizada a limpeza para

retirada de excesso de tecido adiposo e tecido conjuntivo. Foi adicionado, então, DMEM (4,5 g/mL glicose, L-glutamina e piruvato de sódio – ThermoFisher, Massachusetts, USA) contendo colagenase tipo II (1,5%) (Worthington, New Jersey, USA), tripsina (2,5%) (ThermoFisher, Massachusetts, USA), DNAse I (0,1%) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) e penicilina/estreptomicina (1%) (Lonza, Basel, Switzerland) e os tecidos foram incubados a 37°C por 90 min. Para neutralizar a tripsina foi adicionado o meio de crescimento (meio PGM), contendo soro de cavalo (10%) (ThermoFisher, Massachusetts, USA), soro bovino (10%) (ThermoFisher, Massachusetts, USA), penicilina/estreptomicina (1%) e centrifugado a 1.000 rpm, por 20 min à 4°C. O sobrenadante foi retirado e o pellet foi ressuspendido em meio PGM e filtrado utilizando um filtro de células de 70 µM. Matrigel (0,1%) (Corning, New York, USA) foi adicionado à placa antes dos mioblastos serem plaqueados numa densidade de 2x10⁵ células em placa de 6 poços e incubados a 37°C em atmosfera de 5% de CO2. Após 48 h, metade do meio PGM foi retirado e foi adicionado a mesma quantidade de meio de fusão (meio FM) contendo soro de cavalo (10%) e L-glutamina (200 µM) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). As células ficaram completamente diferenciadas em miotubo após 7 dias da extração, quando foram expostas aos diferentes tratamentos e realizados os experimentos.

4.3.2. Cultura de células C2C12

A linhagem de célula de camundongo C2C12 (ATCC, Virginia, USA) foi plaqueada em densidade de $2x10^5$ células em placa de 6 poços e incubada em meio de crescimento (meio FBS) contendo DMEM alta glicose (25 mM), soro fetal bovino (10%) e penicilina/estreptomicina (1%), sendo então mantida em incubadoras a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Quando as células atingiram 90-100% de confluência, o meio de crescimento foi substituído pelo meio de diferenciação (meio HS) contendo DMEM alta glicose (25 mM), soro de cavalo (2%) e penicilina/estreptomicina (1%). Os experimentos foram realizados com as células completamente diferenciadas em miotubos 5 dias após a adição do meio HS.

4.3.3. Cultura de células MEF

Linhagem celular de fibroblastos de camundongo MEF (ATCC, Virginia, USA) foi utilizada pela facilidade de transfecção e manipulação gênica. As células foram descongeladas e centrifugadas a 800 g por 5 min. Em seguida, foram ressuspendidas em meio de crescimento (meio FBS) contendo DMEM alta glicose (25 mM), soro fetal bovino (10%) e penicilina/estreptomicina (1%), plaqueadas em garrafas 75cm² e incubadas em estufa de CO₂

(5%), a 37°C, até atingirem a confluência de 90%. Tripsina (1%) foi utilizada para remoção das células e plaqueadas utilizando meio de crescimento em densidade de $2x10^5$ células por poço, em placas de 6 poços.

4.3.4. Cultura de células HEK293T

Células de embrião de rim humano *Human Embryonic Kidney* 293 (HEK 293T – ATCC, Virginia, USA) foram utilizadas pela facilidade de transfecção e manipulação gênica. Após o descongelamento, as células foram centrifugadas a 800 g por 5 min e ressuspendidas em meio de crescimento (meio FBS) contendo DMEM alta glicose (25 mM), soro fetal bovino (10%) e penicilina/estreptomicina (1%) para cultivo em garrafas 75cm² e encubadas estufa de CO₂ (5%), à 37°C até atingirem a confluência de 90%. Após esse estágio, as células foram incubadas por 3 min a 37°C em meio contendo tripsina (1%) para remoção e plaqueamento. Posteriormente, foi utilizado meio de crescimento para bloqueio da atividade da tripsina as células foram centrifugadas à 800 g por 5 min. Em seguida, as células foram ressuspendidas e DMEM contendo soro fetal bovino (10%) e plaqueadas 70.000 células por poço, em placas de 24 poços.

4.3.5. Transfecção de scramble, mimic e inibidor de Let-7b-5p

As células primárias de músculo de camundongo $(1,5x10^5$ células/poço) foram diferenciadas usando meio FM por três dias. No dia 4, o meio FM foi retirado e a transfecção de *scramble, mimic* de *Let-7b-5p* ou inibidor de *Let-7b-5p* (200 µM) (ThermoFisher, Massachusetts, USA) foi realizada utilizando *Kit Lipofectamine RNAimax* (Introvigen-ThermoFisher, Massachusetts, USA), em meio com soro reduzido OPTI-MENTM (ThermoFisher, Massachusetts, USA) de acordo com o protocolo da empresa. Após adicionar o meio de transfecção, as células foram incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 6 h. Após este período, foi adicionado meio FM e as células incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por mais 48 h, até completar a diferenciação.

4.3.6. Validação da interação do Let-7b-5p e da região 3'UTR PGC1a

Na fase de validação da interação miRNA/mRNA foi utilizado MIRWALK 2.0 (http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/custom.html) para fazer análise de bioinformática e predição de interação entre o miRNA *Let-7b-5p* e os genes que controlam a biogênese mitocondrial. Foi selecionado apenas os genes preditos por pelo menos 5 dos 12 algoritmos de predição utilizados no MIRWALK 2.0. Após o tratamento dos dados, foram

escolhidos os genes PGC1 α e PGC1 β como alvos do estudo. Foi utilizado o plasmídeo (Promega, Wisconsin, USA) para a clonagem da região 3'UTR de PGC1 α e PGC1 β , utilizando 20 U das enzimas XbaI e XhoI (NEB, Massachusetts, USA). Células Hek293t foram co-transfectadas usando lipofectamina 3000 (Introvigen-ThermoFisher, Massachusetts, USA) com 0,5 µg do plasmídeo pmirGLO com a região 3'UTR de PGC1 α e PGC1 β clonados, 5 nM de *scramble, mimic* ou inibidor de *Let-7b-5p*. Após 24 h de transfecção, as células foram lisadas e a atividade da luciferase foi medida através do *Dual-Glo luciferase assay system* (Promega, Wisconsin, USA) de acordo com o protocolo da empresa. Após ensaios de atividade de luciferase, foi analisada a expressão da proteína PGC1 α em células primárias transfectadas com *scramble, mimic* ou inibidor de *Let-7b-5p*. Após 48 h de transfecção, as células foram lisadas para análise de expressão por *western blotting*.

4.3.7. Tratamento de ativador de AMPk, agonista e antagonista de PPAR

As células primárias de músculo de camundongo $(1,5x10^5$ células/poço) foram diferenciadas usando meio FM por cinco dias. No dia 5, o meio FM foi retirado e um novo meio FM com Aicar (250 µM) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) ou Gw501516 (100 nM) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) foi adicionado. Nas células controles do tratamento com Aicar, foi adicionado ao meio H₂O como veículo, enquanto nas células controles do tratamento com GW501516, foi adicionado ao meio DMSO como veículo. Após 1 ou 3 h de tratamento, o meio foi retirado e as células lavadas com PBS e coletadas para extração de proteína ou RNA. No tratamento com antagonista de PPAR, as células primárias de músculo de camundongo ($3x10^4$ células/poço) foram diferenciadas usando meio FM por três dias. No dia 4, o meio FM foi retirado e um novo meio FM com DMSO ou Gsk0660 (5 µM) (Caiman, Michigan, USA) foi adicionado à placa. Após 24 ou 36 h de tratamento, o meio foi retirado e as células para extração de proteína ou RNA.

4.3.8. Transfecção de plasmídeo pCDNA, PGC1a e NCOR1

As células primárias $(1,5x10^5 \text{ células/poço})$ foram diferenciadas usando meio FM por três dias. No dia 4, o meio FM foi retirado e a transfecção realizada utilizando, vetor vazio (pCDNA) (1 µg), PGC1a (gene inserido em plasmídeo pCDNA) ou NCOR1 (gene inserido em plasmídeo pCDNA) através do *Kit Lipofectamine 3000* (Introvigen-ThermoFisher, Massachusetts, USA) em meio OPTI-MENTM (Introvigen-ThermoFisher, Massachusetts, USA). Após adição do meio de transfecção, as células foram incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 6 h. Após este período, foi adicionado meio FM e as células foram incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por mais 48 h, até completar a diferenciação.

4.4. Extração de RNA total

As células e o tecido muscular foram lisados em TRIzol (1 mL) (Introvigen-ThermoFisher, Massachusetts, USA), acrescidas de clorofórmio (200 μ L) e centrifugados a 10.000 g, por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo eppendorf livre de RNAses e, após adição de isopropanol (1 mL), foi deixado por 10 min em temperatura ambiente. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 7.000 g, por 10 min a 4°C. O isopropanol foi retirado e o RNA precipitado foi lavado com etanol (75%) e novamente centrifugado a 7.000 g, por 5 min a 4°C. O sedimento de RNA foi secado à temperatura ambiente, ressuspenso em água livre de RNase e armazenado a -80°C. A quantificação do RNA foi realizada por espectrofotometria a 260/280 nm (HIGUCHI et. al., 1992).

4.5. Reação de transcrição reversa

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir do RNA total (1 μ g) e utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Introvigen-ThermoFisher, Massachusetts, USA) seguindo todas as instruções dos fabricantes.

4.6. Reação de PCR em tempo real

A expressão dos genes de interesse nesse projeto foi quantificada por RT-PCR em 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, California, USA). As reações foram realizadas em *mix* com volume final de 10 μ l, contendo *mix* SYBR Green PCR Master (5 μ l) (dNTP, tampão de reação, Taq DNA polimerase e SYBER Green I) (Introvigen-ThermoFisher, Massachusetts, USA), cDNA da amostra (50nM), sequência de *primers* (sense e anti sense) (0,3 μ M), e água DEPC. As condições dos ciclos utilizadas foram 95° C por 20 s,

40 ciclos a 95° C por 3 s e 60° C por 30 s, seguido da curva de *melting* à 95° C por 15 s, 60° C por 60 s, 95° C por 15 s e 60° C por 15 s. A expressão relativa dos mRNAs analisados foi determinada a partir do método 2 $^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK et. al., 2001).

4.7. Lista de primers para reação de PCR em tempo real

Foram utilizados os primers (Exxtend, Campinas, BRA) com as seguintes sequências:

| Primers | Forward | Reverse |
|---------|-------------------------|-------------------------|
| PDK4 | GGATTACTGACCGCCTCTTTAG | GTAACCAAAACCAGCCAAAGG |
| PGC1a | CCCTGCCATTGTTAAGACC | TGCTGCTGTTCCTGTTTTC |
| NCOR1 | CTGGTCTTTCAGCCACCATT | CCTTCATTGGATCCTCCATC |
| LIN28a | TGGTGGTGTGTGTTCTGTATTGG | GTAGCACCTGTCTCCTTTGGAT |
| NFkBIa | ATCCTGACCTGGTTTCGCTC | CTGTATCCGGGTACTTGGGC |
| ΤΝΓα | GATCGGTCCCCAAAGGGATG | CCACTTGGTGGTGTTTGTGAGTG |
| TBP | GTTGGGCTTCCCAGCTAAGT | CACAAGGCCTTCCAGCCTTA |
| RPL39 | CAAAATCGCCCTATTCCTCA | AGACCCAGCTTCGTTCTCCT |

4.8. Análise da expressão de miRNA

Foram utilizados 50 ng de RNA total extraídos de células e 20 ng de RNA total extraídos de músculos de camundongos treinados para as reações de transcrição reversa. O cDNA foi sintetizado a partir do kit TaqMan® *Micro-RNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, California, USA) utilizando os primers *stem-loop* para *Let-7b-5p*, hsa-RNU24a e mmu-SNO-202 do kit TaqMan® *MicroRNA Assays* conforme as instruções do fabricante. Reações de PCR foram realizadas com TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, California, USA), oligonucleotídeos e sondas TaqMan® MicroRNA Assay (Applied Biosystems, California, USA) e 12,5 ng do cDNA das amostras de célula e 5ng de cDNA das amostras de camundongos. Todas as reações foram realizadas em sistema Real Time PCR 7500 (Applied Biosystems, California, USA). A expressão relativa do miRNA foi determinada a partir do método 2^{$-\Delta\Delta$ Ct} (LIVAK et. al., 2001).

4.9. Western Blotting

Inicialmente, as amostras de células foram homogeneizadas em 80 µL de tampão de extração de proteína contendo Tris (50 mM, pH 7,4), NaCl (150 mM), EDTA (1 mM), Triton X-100 (1%), deoxicolato de sódio (1%), solução de dodecil sulfato de sódio (SDS 1%)

acrescido de inibidores de proteases (aprotinina (5 µg/mL), leupeptina (1 mg/mL), fluoreto de fenilmetilsufonil PMSF (2 mM)) e inibidores de fosfatase (ortovanadato de sódio (100 mM), pirofosfato de sódio (100 mM), fluoreto de sódio (10 mM)). As amostras foram sonicadas por pulsos à 30% durante 20 s e incubadas em gelo por mais 30 min. Em seguida, foram centrifugadas a 12.000 g, por 20 min, à 4°C e coletado o sobrenadante. O método de Pierce foi utilizado para quantificação de proteínas nas amostras, utilizou-se alíquota do sobrenadante diluída 10x. Para o Western Blotting, amostras dos sobrenadantes contendo 150 µg de proteinas foram ressuspendidos em tampão de amostra LaemmLi (1:4) contendo SDS (4%), Tris-HCl (125 mM), glicerol (20%), DTT (100 mM) e azul de bromofenol (2%, pH 6,8). As amostras foram aquecidas a 95°C, por 5 min, e 50 µg de proteína foram aplicadas em III um sistema mini-gel vertical 8, (modelo Protean Cell Biorad[®]) de acrilamida: bisacrilamida. As corridas foram realizadas utilizando tampão de corrida (Tris-HCl (25mM), glicina (115mM), SDS (0,1%)), mantido à 4 °C, 90 volts por 1 h. Após o início da separação do peso de marcação molecular, a voltagem foi elevada para 100 volts até a saída do corante do gel de acrilamida. Após corrida, as proteínas presentes no gel de poliacrilamida foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando tampão de transferência (Tris-HCl (24,8 mM), glicina (190 mM)), potencial de 115 volts, por 1 h e 30 min. A membrana foi bloqueada a temperatura ambiente por 1 hora em tampão TBS-T (Tris-HCl (0,02 M), NaCl (0,16 M) e Tween-20 (0,1%), pH 7,4) contendo leite desnatado em pó (5%). Após o bloqueio das membranas, foram feitas lavagens de 10 min por 3 vezes com o tampão TBS-T e as membranas foram incubadas overnight a 4°C com diluições 1:1000 dos anticorpos primários, β-actina (Santa Cruz SC81178), β-tubulina (Santa Cruz SC5274), Vinculina (Cell Signaling 4650), Lin28a (abcam ab155542), PPARδ (Invitrogen PA1-823A), PGC1α (Calbiochem mAb4C1.3). Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes por 15 min com TBS-T e incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, diluído 1:10.000 em solução TBST contendo leite desnatado (5%), por 1 hora e 30 min. Foram realizadas três lavagens de 15 min com TBST. Após as lavagens as membranas foram incubadas com reagente para detecção de Western Blotting Amersham ECL (GE Healthcare Illinois, USA).

4.10. Intermediários do ciclo do ácido tricarboxilico (ICAT)

As células primárias $(1,5x10^5 \text{ células/poço})$ foram diferenciadas e transfectadas com *scramble, mimic* ou inibidor de *Let-7b-5p*. Após 48 h de transfecção, foi retirado o meio e as células foram lavadas com PBS. Após retirar todo o PBS, foi adicionado 100 µL de ácido perclórico (0,5 M) e colocado em tubo tipo eppendorf. As amostras foram centrifugadas a

5.000 g, por 10 min a 4°C. O pH de cada amostra foi ajustado para 7.0 utilizando KHCO₃. As concentrações dos ICATs foram determinadas por meio de reações enzimáticas conforme esquematizado abaixo, descrito e curva padrão específica para cada intermediário. A leitura de fluorescência foi realizada 6 vezes, a cada 5min, somando um total de 30 min para cada um dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. Foram utilizadas placas pretas com fundo transparente, sendo as análises realizadas em comprimentos de onda com emissão a 460 e excitação a 360 nm (BERGMEYER, 1974). Para detecção de α-cetoglutarato, a reação foi realizada com a enzima glutamato desidrogenase (9 U/mL) na presença do α-cetoglutarato (amostras controles e tratadas), amônia (36 mM), ADP (2 mM) e NADH (450µM) em meio com tampão fosfato (pH 6,8), a 25°C. Para detecção de malato, a reação foi realizada com a enzima malato desidrogenase (0,9 U/mL), na presença de malato (amostras controles e tratadas) e NAD⁺ (15 mM) em tampão hidrazina-glicina (pH 9) a 37°C. Ao passo que, a concentração de oxaloacetato foi determinada com a enzima malato desidrogenase (0,22 U/mL), na presença do substrato NADH (450 µM) em tampão fosfato (pH 6,8). Para os três ICATs: α -cetoglutarato, malato e oxaloacetato, foram realizadas previamente curvas de calibrações utilizando-se concentrações conhecidas de NAD⁺/NADH (Figura 3).







4.11. Indução de inflamação com ácido graxo saturado

Foi preparada solução estoque de ácido palmítico (100 mM) (Sigma, USA) diluído em etanol 100%. Previamente, o ácido palmítico foi diluído para ficar na concentração final de 500 μM em meio HS 2% e conjugado a albumina (1%), à 37° C, por 1 h sob agitação em

shaker. Como controle experimental da solução de ácido palmítico, utilizamos HS (2%), albumina (1%) e o mesmo volume de etanol utilizado no meio com ácido palmítico.

4.12. Conteúdo mitocondrial

Análise do conteúdo mitocondrial foi realizada através da quantificação da fluorescência usando o marcador de mitocôndrias *MitoTracker™ Deep Red FM* (Introvigen-ThermoFisher, Massachusetts, USA).

4.13. Análise estatística

Os dados estão representados com valores de média ± erro padrão. A normalidade dos dados foi testada através do teste de Kolmogorv-Smirnov. Foi aplicado o *Test t student* não pareado para experimentos com células que continham apenas dois grupos experimentais. Experimentos com mais de dois grupos experimentais, foi utilizado *Anova one-way*. Valores de p≤0,05 foram considerados significativos. As figuras foram montadas utilizando o software GraphPad Prism 5.

3. RESULTADOS

Em nossa busca por alvos de *Let-7b-5p*, utilizamos MIRWALK 2.0, que compila 12 outros algoritmos de predição de interação miRNA com a região 3'UTR mRNA. A partir desse ponto, o MIRWALK 2.0 gera uma lista com todos os alvos preditos por pelo menos um dos algoritmos. A primeira lista gerou aproximadamente 17.700 genes com predição de interação da região 3'UTR com *Let-7b-5p*. Excluímos todos os genes que não foram preditos por pelos menos cinco dos dez algoritmos. O número de alvos, então, foi reduzido para 2.577 genes. Dentre estes, buscamos pelos principais envolvidos no processo de biogênese mitocondrial com o maior número de algoritmos de predição na interação miRNA-mRNA e encontramos PGC1 α (6 algoritmos preditos), PGC1 β (9 algoritmos preditos) e NCoR1 (5 algoritmos preditos) (Figura 4).

| Δ | | | Posição 7027-7033 |
|----------|----------------|----|--|
| 11 | PPARGC1A 3'UTR | 5′ | GUUCCUUUUCUCAUG UACCUCA C |
| | let - 7b - 5b | 31 | IIIGGUGUGUGUGGAUGAUGAUGAG |
| | iet ib op | 5 | 7mer-11 |
| | | | |
| R | | | Posição 24-30 |
| D | PPARGC1B 3'UTR | 5′ | UUAACCCUCGAGGAA <mark>UACCUC</mark> AA |
| | | | 11111 |
| | let-7b-5p | 31 | UUGGUGUGUUGGAUG <mark>AUGGAG</mark> U |
| | | | 7mer-A1 |
| С | | | Posição 774-780 |
| C | NCoR1 3'UTR | 5′ | GGCUUAUUUGAGGCA <mark>UACCUCA</mark> C |
| | | | |
| | let-7b-5p | 3' | UUGGUGUGUUGGAUG AUGGAG U |
| | | | 7mer-A1 |

Figura 4. Genes preditos como alvos de *Let-7b-5p*. A) Região *seed* de interação entre 3'UTR PGC1 α e miRNA *Let-7b-5p*. B) Região seed de interação entre 3'UTR PGC1 β e miRNA *Let-7b-5p*. C) Região *seed* de interação entre 3'UTR NCoR1 e miRNA *Let-7b-5p*.

Através de ensaio reporter, mostramos que há interação física do *Let-7b-5p* com a região 3'UTR de PGC1 β e PGC1 α . Em diferentes concentrações, *Let-7b-5p* reduziu a atividade de luciferase nas duas construções, 3'UTR de PGC1 α e PGC1 β (Figura 5a e 5c). A partir desse ponto, decidimos direcionar os experimentos para validação apenas do PGC1 α , devido seu protagonismo na função e biogênese mitocondrial. Após transfectar o inibidor de *Let-7b-5p*, observamos aumento na atividade de luciferase utilizando a construção 3'UTR PGC1 α (Figura 5b).



Figura 5. Ensaio de luciferase utilizando uma construção contendo PGC1 α e PGC1 β na presença de *mimic* ou inibidor de Let-7b-5p. A) Plasmídeo com inserto 3'UTR PGC1 α e transfecção de *mimic* do *Let-7b-5p* em células HEK 293T. B) Plasmídeo com inserto 3'UTR PGC1 α e transfecção do inibidor de *Let-7b-5p* em células HEK 293T. C) Plasmídeo com

inserto 3'UTR PGC1 β e transfecção de *mimic* do *Let-7b-5p* em células HEK 293T. Scr: *Scramble*/Controle. *p \leq 0,05 vs controle.

Observamos, ainda, que células primárias transfectadas com *mimic* do *Let-7b-5p* apresentaram redução na expressão de PGC1 α (Figura 6a). Utilizamos ainda uma sonda de fluorescência que marca a membrana mitocondrial. A intensidade de fluorescência reduziu em células transfectadas com *mimic* do *Let-7b-5p* (Figura 6b).



В



Figura 6. miRNA Let-7b-5p reduz expressão de PGC1a em células. A) Figura representativa da expressão de PGC1a em células primárias transfectadas com *mimic* do *Let-7b-5p* (200 nM) por 48 h. B) Intensidade de fluorescência da sonda *Mitotracker* em células primárias transfectadas com *mimic* do *Let-7b-5p* (200 nM) por 48 h Scr: *Scramble/*Controle. n=3. *p \leq 0,05 vs controle. Análise estatística: *Test t de Student*.

O próximo passo foi avaliar a expressão de *Let-7b-5p in vivo*. Sóleo de animais treinados foram utilizados para análise da expressão do miRNA. Em camundongos, o grupo treinado (Tr) apresentou redução na expressão de *Let-7b-5p*, enquanto os animais tratados com dieta hiperlipídica (Hfd) apresentaram aumento na expressão deste miRNA, quando comparado ao grupo controle (Ct) (Figura 7).



Figura 7. Exercício físico reduz Let-7b-5p em músculo de animais. Expressão do miRNA *Let-7b-5p* em sóleo de animais controles (Ct), treinados (Tr) e tratados com dieta hiperlipídica (Hfd). n=5 animais. *p \leq 0,05 vs controle. Análises estatísticas: A) Anova *One-way*, pós-teste Tukey.

A partir deste ponto, nosso objetivo foi mostrar qual a via está sendo ativada pelo exercício físico para controlar a expressão de *Let-7b-5p* em músculo. Para explorarmos as vias de sinalização, tratamos células primárias com fármacos conhecidos como miméticos de exercício físico, AICAR (ativador de AMPK) e GW501516 (agonista de PPAR β). Como controle da atividade de PPAR em resposta ao Gw, usamos Pdk4, um gene controlado por PPAR (ABBOT et. al., 2005). Em nossos resultados, observamos que o tratamento com GW50156, aumentou a expressão de gênica de PDK4 e Lin28a em 1 e 3 h (Figura 8a e 8b). No entanto, o tratamento com Aicar reduz a expressão gênica de Pdk4 e Lin28a após 3 h de tratamento (Figura 8c).



Figura 8. Expressão gênica de Lin28a e PDK4 em resposta a miméticos de exercício físico em células primárias. A) Expressão de PDK4 e Lin28a em células tratadas com AICAR (250 μ M) por 3 h. B) Expressão de PDK4 e Lin28a em células primárias tratadas por 1 h com GW501516 (100 nM). C) Expressão de PDK4 e Lin28a em células primárias tratadas por 3 h com GW501516 (100 nM). Ct: controle; Aic: AICAR; GW: GW501516. n=3. *p≤0,05 vs controle. Análise estatística: *Test t de Student* não pareado.

Apesar de não aumentar a expressão gênica de Lin28a, AICAR foi capaz de aumentar o conteúdo proteico de Lin28a após 3 h de tratamento (Figura 7). Após 3 h de tratamento com agonista de PPAR, GW501516, também observamos aumento na expressão proteica de Lin28a (Figura 9).



Figura 9. Miméticos de exercício físico aumentam o conteúdo proteico de Lin28a em células primárias. Imagem representativa do conteúdo proteico de Lin28a em células primárias tratadas por 1 ou 3 h com AICAR (250 μ M) e GW501516 (100 nM). Ct: controle; Aic: AICAR; GW: GW501516. n=3. *p≤0,05 vs controle. Análise estatística: *Test t de Student* não pareado.

Analisamos ainda dados de chip-seq de células C2C12 tratadas com GW501516 e observamos enriquecimento de PPARβ na região promotora de Lin28a (Figura 10). Interessante, o pico de enriquecimento de PPARβ se sobrepõem aos picos de enriquecimento ao fator de transcrição miogenina durante a diferenciação de C2C12.



Figura 10. PPARβ está enriquecido na região promotora de Lin28a em C2C12. Figura montada a partir de análise de chip-seq realizado por Fan e colaboradores (2017) em células C2C12 após 24 h de tratamento com GW501516.

Para bloquear a atividade transcricional de PPAR β , utilizamos o antagonista farmacológico GSK0660. O tratamento por 16 e 36 h com GSK reduziu a expressão gênica de PDK4, demonstrando que a atividade de PPAR β estava reduzida (Figura 11a e 11b). A expressão gênica de Lin28a reduziu em ambos os pontos de tratamento (Figura 11a e 11b). A expressão proteica de Lin28a reduziu somente após 36 h de tratamento com o antagonista de PPAR β (Figura 11c).



Figura 11. Antagonista de PPARβ reduz a expressão de Lin28a em células primárias. A) Expressão gênica de PDK4 e Lin28a em células tratadas por 16 h com GSK0660 (5 μM). B) Expressão gênica de PDK4 e Lin28a em células tratadas por 36 h com GSK0660 (5 μM). C) Imagem representativa do conteúdo proteico de Lin28a em células tratadas por 36 h com GSK0660 (5 μM). Ct: controle; GSK: GSK0660. n=3. *p≤0,05 vs controle. Análise estatística: *Test t de Student* não pareado.

Utilizamos um plasmídeo pCDNA com inserto do gene PGC1 α , co-ativador de PPAR, para aumentar a atividade transcricional de PPAR β . A superexpressão de PGC1 α aumentou a expressão gênica de PDK4 e Lin28a, reduzindo a expressão do miRNA *Let-7b-5p* (Figura 12a). O aumento na atividade de PPAR β pela transfecção de PGC1 α , também aumentou a expressão proteica de Lin28a (Figura 12b).



Figura 12. Superexpressão de PGC1a aumenta a expressão de Lin28a e reduz *Let-7b-5p* em células primárias. A) Expressão gênica de PGC1a, PDK4, Lin28a e do miRNA *Let-7b-5p* em células transfectadas com PGC1a (1µg) por 48 h. B) Imagem representativa do conteúdo proteico de PGC1a e Lin28a em células transfectadas com PGC1a (1µg) por 48 h. Vazio: vetor sem inserto; PGC1a: vetor com inserto do gene PGC1a. n=3. *p≤0,05 vs vazio. Análise estatística: *Test t de Student* não pareado.

A atividade de PPARβ foi bloqueada com antagonista GSK0660 12h após a transfecção de PGC1α. Observamos que o tratamento com GSK0660 impediu o aumento da expressão dos genes PDK4 ou Lin28a em células primárias transfectadas com PGC1α (Figura 13a e 13b).



Figura 13. Antagonista de PPARβ impede o aumento na expressão de Lin28a mesmo superexpressando PGC1α em células primárias. A) Expressão gênica de PGC1α, PDK4 e Lin28a em células transfectadas com PGC1α (1µg) e, com tratamento de GSK0660 (5µM) 6h antes da transfecção. B) Imagem representativa do conteúdo proteico de Lin28a em células transfectadas com PGC1α (1µg) e tratamento 6h antes da transfecção com GSK0660 (5µM). Veic: Veículo; Vazio: vetor sem inserto; GSK: GSK0660; PGC1α: vetor com inserto do gene PGC1α. n=3. *p≤0,05 vs vazio. Análise estatística: *Test t de Student* não pareado.

Transfectamos células com siRNA para fazer o *Knockdown* de PPAR β em células musculares primárias. Nossos resultados mostram de forma clara que o silenciamento de PPAR β , utilizando siRNA em concentração crescente, reduz a expressão gênica e proteica de LIN28a, resultando em aumento da expressão de *Let-7b-5p* (Figura 14).



Figura 14. *Knockdown* de PPAR β por siRNA reduz a expressão de Lin28a aumentando *Let-7b-5p.* A) Imagem representativa do conteúdo proteico de PPAR β e Lin28a em células musculares primárias transfectadas com siPPAR β (125 e 500 nM) por 48 h. B) Expressão gênica de PDK4, Lin28a e do miRNA *Let-7b-5p* em células musculares primárias transfectadas com siPPAR β (500 nM) por 48 h. Scr: *Scramble/*Controle. n=3. *p≤0,05 vs controle. Análise estatística: *Test t de Student* não pareado.

Após os experimentos em células mostrarem a importância de PPAR na expressão do Lin28a, passamos a analisar a expressão de PPAR β e de LIN28a em músculos de camundongos. Nos animais treinados fisicamente, houve aumento de PPAR β e, como esperado, também na atividade transcricional de PPAR, pois observamos aumento na expressão do gene PDK4 (Figura 15a). Além disso, também houve aumento na expressão de LIN28a no grupo Tr (Figura 15a). Animais do grupo Hfd apresentaram redução na expressão de PPAR β , mas não na expressão de PDK4 (Figura 15a). A expressão de Lin28a também aumentou no grupo Tr e reduziu no grupo Hfd (Figura 15a).



Figura 15. Exercício físico aumenta a expressão de PPAR β e LIN28a em músculo de camundongos. A) Imagem representativa do conteúdo proteico de PPAR β e Lin28a, expressão gênica de PDK4 em sóleo de animais controles (Ct), treinados (Tr) e tratados com dieta hiperlipídica (Hfd). n=3 animais. *p≤0,05 vs controle. A) Anova *One-way*, pós-teste Tukey.

4. DISCUSSÃO

Em nosso trabalho mostramos pela primeira vez a regulação do Let-7b-5p pelo receptor nuclear PPARβ. Na primeira parte do projeto, estudamos o papel do Let-7b-5p no controle genes importantes envolvidos no processo de biogênese e função mitocondrial. Em nosso estudo, por análise de interação do miRNA com 3'UTR de mRNA utilizando o algoritmo mirWALK 2.0, encontramos possíveis interações de Let-7b-5p com PGC1a, PGC1B e NcoR1. Por ensaio repórter, conseguimos mostrar que, de fato, o Let-7b-5p poderia interagir fisicamente com a região 3'UTR de PGC1\u03b3 e PGC1\u03b3. Direcionamos nossas investigações apenas a interação do Let-7b-5p com a molécula de mRNA do PGC1a, devido à sua importância na regulação do processo de biogênese mitocondrial. Embora o PGC1a e PGC1β promovam aumento de genes relacionados com biogênese mitocondrial, PGC1β induz preferencialmente genes envolvidos no controle de genes inflamatórios e reguladores espécies reativas de oxigênio, enquanto PGC1α tem seu papel principal na regulação do processo de biogênese de mitocôndria (ST-PIERRE et. al., 2003). Mostramos então que a superexpressão de Let-7b-5p em células musculares primárias de camundongos leva não somente à redução na expressão proteica do PGC1a, mas também reduz a intensidade de fluorescência de mitotracker, sonda capaz de marcar a membrana mitocondrial. Além disso, em células C2C12, a superexpressão de Let-7b-5p reduziu lactato e aumentou a concentração de oxaloacetato, porém não alterou a concentração de malato ou α-cetoglutarato (Figura 17 suplementar 01). Por outro lado, quando reduzimos a expressão de Let-7b-5p por transfecção de seu inibidor, observamos aumento de α -cetoglutarato, malato e oxaloacetato, indicando uma melhora na atividade do ciclo do ácido tricarboxílico e na função mitocondrial (Figura 17 suplementar 01). Estes experimentos, portanto, mostram que o Let-7b-5p pode controlar PGC1α e alterar a função mitocondrial. Em um estudo anterior, Aoi e colaboradores (2010), mostraram que o miR-696 também é capaz de controlar a expressão de PGC1a. Em células C2C12, a transfecção do miR-696 reduziu a expressão de PGC1 α , ao passo que a transfecção com o inibidor do miR-696 aumentou sua expressão. Os autores observaram ainda que animais com membros posteriores imobilizados apresentaram redução de PGC1a e aumento de miR-696. Por outro lado, o exercício físico aumentou a expressão PGC1a reduzindo a expressão do miR-696.

Buscamos também entender como ocorre a regulação da expressão e biodisponibilidade do miRNA *Let-7b-5p* no controle na biogênese mitocondrial. Em nosso estudo, utilizamos animais como modelo de biogênese de mitocôndria, uma vez que, o

exercício aeróbio é reconhecidamente um potente indutor de biogênese mitocondrial (FIORENZA et. al., 2018; IRRCHER et. al., 2003). Após o exercício físico, nossos resultados mostraram que camundongos apresentaram redução nos níveis de Let-7b-5p no tecido muscular, corroborando com nossa hipótese. Outro estudo recente mostrou que exercício físico reduz a expressão de diversos miRNAs. Barber e colaboradores (2019) mostraram que 20 semanas de exercício à 75% do consumo máximo de oxigênio reduziu a concentração de 14 miRNAs circulantes, sendo o Let-7b-5p um dos mais afetados nesse processo. Interessados em compreender como a expressão de Let-7b-5p é regulada, buscamos por possíveis mecanismos envolvidos no processo de regulação. Um estudo prévio relacionou o aumento da inflamação com o aumento da expressão de Let-7. Os autores mostraram que a proteína conhecida como fator nuclear kappa B (NFκB), pode transcrever membros da família Let-7b (WANG et. al. 2012). Diversos trabalhos mostraram que a obesidade leva ao aumento da expressão de genes inflamatórios e citocinas pró-inflamatórias (HANDSCHIN e SPIEGELMAN, 2008; HOTAMISLIGIL, 2006). O exercício físico, por outro lado, atenua a atividade de NF κ B e reduz a expressão de genes inflamatórios, como TLR4 e TNF α (BRODERICK et. al., 2019; WANG et. al., 2019; CHRISTENSEN et. al., 2019; GOMEZ-HUELGAS et. al. 2019). Corroborando com a literatura e nossa hipótese inicial, mostramos que músculos de animais obesos induzidos por dieta hiperlipídica apresentaram aumento na expressão de Let-7b-5p. Para entender melhor o papel da inflamação em nosso modelo animal, tratamos células com ácido palmítico. Como esperado, houve aumento de inflamação como evidenciado pelo aumento de genes inflamatórios, porém, não observamos aumento da expressão de Let-7b-5p (Figura 18 suplementar 02). É provável que outra via de sinalização, independente de NFkB, controle a expressão de Let-7b-5p no tecido muscular de camundongos.

Decidimos, então, explorar a regulação pós-transcricional de *Let-7b-5p*. As proteínas Lin28a e Lin28b são as princiapis responsáveis pela regulação pós-trancricional dos níveis de de *Let-7* (PISKOUNOVA et.al., 2011). Para ativar em células musculares as mesmas vias que o exercício físico ativa *in vivo*, utilizamos compostos conhecidos como miméticos de exercício físico. Tratamos células primárias de camundongo com GW501516 e AICAR, compostos capazes de ativar o receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) e proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (NARKAR et. al., 2008). Nossos experimentos mostraram redução na expressão dos genes PDK4 e Lin28a em células tratadas por 3 h com AICAR. No entanto, GW501516 promoveu aumento em 1 e 3 h de tratamento. A expressão proteica de Lin28a aumentou apenas em 3 h com o tratamento do GW501516.

Supreendentemente, observamos ainda aumento na expressão da proteína Lin28a após tratamento com AICAR por 3 horas. Nossos resultados corroboram com os dados de um estudo anterior onde os autores mostraram que o aumento na fosforilação de AMPK, promoveu aumento da proteína Lin28a no citoplasma em células de linhagem de câncer gástrico (ZHAO et. al., 2018). Sendo assim, nossos resultados sugerem que a ativação de AMPK aumenta Lin28a de maneira pós-transcricional, uma vez que não foi observado aumento na transcrição. Porém, observamos aumento no conteúdo proteico de Lin28a. Por outro lado, nossos resultados com GW501516 mostraram que o aumento da atividade transcricional de PPAR β levou ao aumento na expressão gênica de Lin28a, sinalizando para um efeito direto no Lin28a, ou seja, o PPARß poderia ter elementos responsivos na região promotora de Lin28a. O PPARB é um fator de transcrição que controla diversas funções celulares, entre elas, o metabolismo. Este fator de transcrição é capaz de modificar a fonte de substrato energético, dando preferência a oxidação de ácidos graxos em detrimento a glicose, sendo portanto considerado um interruptor metabólico (LIU et. al., 2018). Os ácidos graxos poli-insaturados (sigla no inglês PUFA), por exemplo, ácido araquidônico e linoleico, são conhecidos ligantes naturais de PPARB, bem como os metabólitos destes ácidos graxos como a prostaciclina/PGI2, o ácido 13S-hidroxioctadecadienóico (13S-HODE) e o ácido 15Shidroxieicosatetraenóico (15S-HETE) (XU et. al., 1993; SHUREIQI et al., 2003; GUPTA, et. al., 2000; NARUHN et. al., 2010). Sob interação dos ligantes à região conhecida como LBD (domínio de ligação ao ligante), o PPARβ agora ativo, forma complexo transcricionais com outros receptores nucleares, em especial os receptores retinóides X (RXRs), que subsequentemente reconhecem e interagem com os elementos responsivos do proliferador de peroxissomos de repetição direta hexamérica, conhecidos como PPRE, e inicia o processo transcricional de genes alvos (HARMON et. al., 2011). Para testar essa hipótese, o PPARβ regulando diretamente o processo transcricional do Lin28a, realizamos uma análise e tratamento de dados públicos em um experimento de chip-seq realizado por Fan e colaboradores (2017) (Figura 10). Encontramos nestes dados, enriquecimento de PPAR^β na região promotora de LIN28a em células C2C12 tratadas com GW501516 e, assim, direcionamos nossos experimentos para o receptor nuclear PPARB. Em nossos resultados, a ativação de PPARβ por GW501516 em células C2C12 foi tardia em resposta ao tratamento (Figura 19 suplementar 03). Enquanto nas células primárias, já conseguimos observar aumento na expressão de PDK4 após uma hora de tratamento. Em C2C12, somente após 3h observamos aumento de PDK4 (Figura 19 suplementar 03). Além disso, foram necessárias 12h de tratamento para observamos aumento na expressão gênica e proteica de LIN28a (Figura 19 suplementar 03). Como contra prova, utilizamos o antagonista de PPAR_β, GSK0660, em células primárias de camundongos. Ao contrário do agonista, o tratamento de 16 ou 36h reduziu a expressão gênica e proteica de LIN28a. Além de antagonista, agonistas e ácidos graxos insaturados, a atividade PPARβ pode também ser regulada por co-ativadores e co-repressores. Quando há ausência de ligantes agonistas de PPARB, os complexos corepressores se ligam ao complexo transcricional formado por PPARB e outro receptor nuclear, como por exemplo, RXR ou ERR, inibindo a atividade transcricional de PPARβ. Por outro lado, a interação de ligantes agonistas com o PPARβ leva a dissociação da ligação dos complexos co-repressores e recrutamento de co-ativadores, promovendo a transcrição dos genes alvos (HARMON et. al., 2011). PGC1α é um importante co-ativador de PPARβ, enquanto NCOR1 e SMRT são co-repressores (PUIGSERVER et. al., 1998; MOTTIS, MOUCHIROUD e AUWERX, 2013). Para fortalecer nossa hipótese, transfectamos o coativador PGC1a e, nossos resultados, mostraram aumento de LIN28a e redução na expressão de Let-7b-5p. No entanto, o bloqueio de PPARβ com antagonista, levou a inibição da expressão de Lin28a. Além disso, o silenciamento do PPARβ reduziu a expressão de LIN28 aumentando a expressão do Let-7b-5p. Em células MEF, a transfecção com NcoR1, um corepressor nuclear que inibe a atividade de PPAR (FAN e EVANS, 2015; YAMAMOTO et. al., 2011; FEIGE e AUWERX, 2007), promoveu redução na expressão proteica e gênica de LIN28a. Ao passo que, a transfecção de PGC1a aumentou a expressão proteica de LIN28a (Figura 20 suplementar 04). Nossos experimentos, portanto, mostram que in vitro a expressão de LIN28a pode ser controlada por PPARB. Além disso, em camundongos, também fomos capazes de mostrarmos aumento na expressão de PPARB e LIN8a em resposta ao exercício físico, sugerindo que esse mecanismo é conservado em camundongos. Estudos anteriores já haviam demonstrado que o exercício físico ativa PPAR e que esta proteína tem papel chave na transcrição de genes envolvidos na função mitocondrial (JORDAN et. al., 2017; NARKAR et. al. 2006). Nossos experimentos adicionam o miRNA Let-7b-5p como mais uma molécula envolvida neste processo associado ao controle de biogênese/função mitocondrial. Além disso, atribuímos ao PPARB, ativado por agonistas ou exercício físico, um papel essencial no controle deste miRNA no tecido muscular esquelético.

5. CONCLUSÃO

O controle da expressão de *Let-7b-5p* é mediado via ativação do eixo PPAR β /LIN28a. Neste contexto, o aumento na transativação do PPAR β parece estar diretamente associado a indução de LIN28a e, consequentemente, redução na expressão do *let-7b-5p*. Além disso, nossos resultados mostram que o PGC1 α é alvo direto do *Let-7b-5p*, sugerindo que o controle da expressão desse miRNA contribui com a manutenção do processo de biogênese e função mitocondrial em células musculares esqueléticas. Vale ressaltar que o controle desse eixo envolvendo, fator de transcrição, co-reguladores e miRNA, abre perspectivas para o controle de doenças metabólicas associadas ao processo de disfunção mitocondrial em tecidos periféricos.



Figura 16. Sumário Gráfico. A ativação de PPAR β pelo exercício físico, PGC1 α ou por GW501516 é responsável pela aumento na expressão de LIN28a, uma proteína ligante de mRNA, conhecida também com proteína esponja, que impede o processo de maturação do miRNA *Let-7b-5p*. Por outro lado, bloqueio de PPAR β por antagonista GSK0660 ou siRNA, reduz a expressão de Lin28a e aumenta a expressão de *Let-7b-5p*.

REFERÊNCIA

ABBOT, E.L.; MCCORMACK, J.G.; REYNET, C.; HASSALL, D.G.; BUCHAN, K.W.; YEAMAN, S.J. Diverging regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoform gene expression in cultured human muscle cells. **FEBS J.**, v. 272, n. 12, p.3004-3014, jun 2005.

ALMEIDA, M.I.; REIS, R.M.; CALIN, G.A. MicroRNA history: Discovery, recent application, and next frontiers. **Mutat Res**., n. 717, v. 1-2, p. 1-8, dec 2011.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. Nature., n. 431, v. 7006, p. 350-355, set 2004.

AOI, W.; NAITO, Y.; MIZUSHIMA, K.; TAKANAMI, Y.; KAWAI, Y.; ICHIKAWA, H.; YOSHIKAWA, T. The microRNA miR-696 regulates PGC-1{alpha} in mouse skeletal muscle in response to physical activity. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, n.298, v. 4, p. 799-806, apr 2010.

ASHRAFIAN, H.; FRENNEAUX, M.P.; OPIE, L.H. Metabolic mechanisms in heart failure. **Circulation**, n. 116, v. 4, p. 434-448, jul 2007.

BALZEAU, J.; MENEZES, M.R.; CAO, S.; HAGAN, J.P. The LIN28/let-7 Pathway in Cancer. Front Genet., n. [s.n.], v 8, p. 1-16, mar 2017.

BARBER, J.L.; ZELLARS, K.N.; BARRINGHAUS, K.G.; BOUCHARD, C.; SPINALE, F.G.; SARZYNSKI, M.A. The Effects of Regular Exercise on Circulating Cardiovascularrelated MicroRNAs. **Sci Rep.**, n.9, v.1, p. 7527, mai 2019.

BARTEL, D.P. Metazoan MicroRNAs. Cell., n. 173, v. 1, p. 20-51, mar 2018.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**., n. 116, v. 2, p. 281-297, jan 2004.

BERGMEYER, H.U. Methods of Enzymatic analysis. New York: Academic, United States, ed. 2, p. 120-301, 1974.

BIAMONTE, F.; SANTAMARIA, G.; SACCO, A.; PERRONE, F.M.; DI CELLO, A.; BATTAGLIA, A.M.; SALATINO, A.; DI VITO, A.; AVERSA, I.; VENTURELLA, R.; ZULLO, F.; COSTANZO, F. MicroRNA let-7g acts as tumor suppressor and predictive biomarker for chemoresistance in human epithelial ovarian cancer. **Sci Rep.**, n.9, v. 1, p. 5668, abr 2019 BRODERICK, T.L.; SENNOTT, J.M.; GUTKOWSKA, J.; JANKOWSKI, M. Antiinflammatory and angiogenic effects of exercise training in cardiac muscle of diabetic mice. **Diabetes Metab Syndr Obes.**, n.12, [s.v], p. 565-573, abr 2019.

CAI, H.; CHEN, Y.; YANG, X,. MA, S.; WANG, Q.; ZHANG, Y.; NIU, X.; DING, G.; YUAN, Y. Let7b modulates the Wnt/β-catenin pathway in liver cancer cells via downregulated Frizzled4. **Tumour Biol**., n. 39, v. 7, p.1-7, jul 2017.

CARTONI, R.; LÉGER, B.; HOCK, M.B.; PRAZ, M.; CRETTENAND, A.; PICH, S.; ZILTENER, J.L.; LUTHI, F.; DÉRIAZ, O.; ZORZANO, A.; GOBELET, C.; KRALLI, A.; RUSSELL, A.P. Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. **J Physiol.**, n. 567, v. 1. P. 39-358, aug 2005.

CHEN, C.; RIDZON, D.A.; BROOMER, A.J.; ZHOU, Z.; LEE, D.H.; NGUYEN, J.T.; BARBISIN, M.; XU, N.L.; MAHUVAKAR, V.R.; ANDERSEN, M.R.; LAO, K.Q.; LIVAK, K.J.; GUEGLER, K.J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, n. 33, v. 20, p 179, nov 2005.

CHRISTENSEN, R.H.; WEDELL-NEERGAARD, A.S.; LEHRSKOV, L.L.; LEGAARD, G.E.; DORPH, E.; LARSEN, M.K.; LAUNBO, N.; FAGERLIND, S.R.; SEIDE, S.K.; NYMAND, S.; BALL, M.; VINUM, N.B.; DAHL, C.N.; HENNEBERG, M.; RIED-LARSEN, M.; BOESEN, M.P.; CHRISTENSEN, R.; KARSTOFT, K.; KROGH-MADSEN, R.; ROSENMEIER, J.B.; PEDERSEN, B.K.; ELLINGSGAARD, H. Effect of aerobic and resistance exercise on cardiac adipose tissue: a secondary analyses from a randomized clinical trial. JAMA Cardiol. [s.n], [s.v], [s.p], jul 2019.

CIVITARESE, A.E.; CARLING, S.; HEILBRONN, L.K.; HULVER, M.H.; UKROPCOVA, B.; DEUTSCH, W.A.; SMITH, S.R.; RAVUSSIN, E.; CALERIE PENNINGTON TEAM. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. **PLoS Med**., n. 4, v. 3, p. e76, mar 2007.

COEN, P.M.; MENSHIKOVA, E.V.; DISTEFANO, G.; ZHENG, D.; TANNER, C.J.; STANDLEY, R.A.; HELBLING, N.L.; DUBIS, G.S.; RITOV, V.B.; XIE, H.; DESIMONE, M.E.; SMITH, S.R.; STEFANOVIC-RACIC, M.; TOLEDO, F.G.; HOUMARD, J.A.; GOODPASTER, B.H. Exercise and Weight Loss Improve Muscle Mitochondrial Respiration, Lipid Partitioning, and Insulin Sensitivity After Gastric Bypass Surgery. **Diabetes.**, n. 64, v. 11, p. 3737-3750, nov 2015.

DAVALOS, A.; GOEDEKE, L.; SMIBERT, P.; RAMIREZ, C.M,; WARRIER, N.P.; ANDREO, U.; CIRERA-SALINAS, D.; RAYNER, K.; SURESH, U.; PASTOR-PAREJA, J.C.; ESPLUGUES, E.; FISHER, E.A.; PENALVA, L.O.; MOORE, K.J.; SUAREZ, Y.; LAI, E.C.; FERNANDEZ-HERNANDO C. MiR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, n. 108, v. 22, p.9232–9237, mai 2011.

DRUMMOND, M.J.; MCCARTHY, J.J.; SINHA, M.; SPRATT, H.M.; VOLPI, E.; ESSER, K.A.; RASMUSSEN, B.B. Aging and microRNA expression. In human skeletal muscle: a microarray and bioinformatics analysis. **Physiol Genomics**. N. 43, v. 10, p. 295-603, mai 2011.

ELDOR, R.; NORTON, L.; FOURCAUDOT, M.; GALINDO, C.; DEFRONZO, R.A.; ABDUL-GHANI, M. Increased lipid availability for three days reduces whole body glucose uptake, impairs muscle mitochondrial function and initiates opposing effects on PGC-1a promoter methylation in healthy subjects. **PLoS One**, n. 12, v. 12, p. e0188208, dez 2017.

ELIA, L; CONTU, R.; QUINTAVALLE, M.; VARRONE, F.; CHIMENTI, C.; RUSSO, M.A CIMINO, V.; DE MARINIS, L.; FRUSTACI, A.; CATALUCCI, D.; CONDORELLI, G. Reciprocal regulation of MicroRNA-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in pathological conditions. **Circulation.**, n. 120, v. 23, p. 2377-2385, 2009.

FAN, W.; EVANS, R. PPARs and ERRs: molecular mediators of mitochondrial metabolism. **Curr Opin Cell Biol.**, n. 33, p. 49-54, apr 2015.

FAN, W.; WAIZENEGGER, W.; LIN, C.S.; SORRENTINO, V.; HE, M.X.; WALL, C.E.; LI, H.; LIDDLE, C.; YU, R.T.; ATKINS, A.R.; AUWERX, J.; DOWNES, M.; EVANS, R.M. PPARδ promotes running endurance by preserving glucose. **Cell Metab.**, n.25, v. 5, p. 1186-1193, mai 2017.

FARZANEH, M.; ATTARI, F.; KHOSHNAM, S.E. Concise Review: LIN28/Let-7 signaling, a critical double-negative feedback loop during pluripotency, reprogramming and tumorigenicity. **Cell Reprogram.**, n. 19, v. 5, p. 289-293, out 2017.

FEIGE, J.N.; AUWERX, J. Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis. **Trends Cell Biol.**, n. 17, v. 6, p. 292-301, jun 2007.

FERNANDEZ-MARCOS, P.J.; AUWERX, J. Regulation of PGC-1a, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. **Am J Clin Nutr.**, n. 93, v. 4, p. 884-890, abr 2011.

FIORENZA, M.; GUNNARSSON, T.P.; HOSTRUP, M.; IAIA, F.M.; SCHENA, F.; PILEGAARD, H.; BANGSBO, J. Metabolic stress-dependent regulation of the mitochondrial biogenic molecular response to high-intensity exercise in human skeletal muscle. **J Physiol**., n. 596, v. 14, p. 2823-2840, jul 2018.

FROST, R.J.; OLSON, E.N. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, n. 108, v. 52, p. 21075-80, 2011.

GE, G.; YANG, D.; TAN, Y.; CHEN, Y.; JIANG, D.; JIANG, A.; LI, Q.; LIU, Y.; ZHONG, Z.; LI, X.; ZHANG, S.; ZHU, L. miR-10b-5p Regulates C2C12 Myoblasts Proliferation and Differentiation. **Biosci Biotechnol Biochem**., n. 83, v. 3, p. 291-299, fev 2019.

GILL, J.F.; DELEZIE, J.; SANTOS, G.; MCGUIRK, S.; SCHNYDER, S.; FRANK, S.; RAUSCH, M.; ST-PIERRE, J.; HANDSCHIN C. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α regulates mitochondrial calcium homeostasis, sarcoplasmic reticulum stress, and cell death to mitigate skeletal muscle aging **Aging Cell**., [s;n], [s.v], p. 1-13, julh 2019.

GOMEZ-HUELGAS, R.; RUIZ-NAVA, J.; SANTAMARIA-FERNANDEZ, S.; VARGAS-CANDELA, A.; ALARCON-MARTIN, A.V.; TINAHONES, F.J.; BERNAL-LOPEZ, M.R. Impacto f intensive lifestyle modification on levels of adipokines and inflammatory biomarkers in metabolically health obese women. **Mediators Inflamm**., [s.n], [s.v], p. 4165260, abr 2019.

GUPTA, R.A.; TAN, J.; KRAUSE, W.F.; GERACI, M.W.; WILLSON, T.M.; DEY, S.K.; DUBOIS, R.N. Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n. 97, v. 24, p. 13275-13280, nov 2000.

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B.M. The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. **Nature**., n. 454, v. 7203, p. 463-469, jul 2008

HARDIE, D.G.; ROSS, F.A.; HAWLEY, S.A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, n. 13, v. 4, p. 251-262, mar 2012.

HARMON, G.S.; LAM, M.T.; GLASS, C.K. PPARs and lipid ligands in inflammation and metabolism. **Chem Rev.**, n. 111, v. 10, p. 6321-6340, out 2011.

HEO, I.; JOO, C.; CHO, J.; HÁ, M.; HAN, J.; KIM, V.N. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. **Mol Cell.**, n.32, v. 2, p. 276-284, out 2008.

HEO, I.; JOO, C.; KIM, Y.K.; HÁ, M.; YOON, M.J.; CHO, J.; YEOM, K.H.; HAN, J.; KIM, V.N. TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. **Cell.**, n. 138, v. 4, p. 696-708, aug 2009.

HERNANDEZ-MIJARES, A.; ROCHA, M.; APOSTOLOVA, N.; BORRAS, C.; JOVER, A.; BAÑULS, C.; SOLA, E.; VICTOR, V.M. Mitochondrial complex I impairment in leukocytes from type 2 diabetic patients. **Free Radic Biol Med.**, n. 50, v. 10, p. 1215-1221, mai 2011.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P.S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology** (NY)., n 10, v. 4, p. 413-417, abr 1992.

HONARDOOST, M.; AREFIAN, E.; SOLEIMANI, M.; SOUDI, S.; SAROOKHANI, M.R. Development of Insulin Resistance through Induction of miRNA-135 in C2C12 Cells. **Cell J**., n. 18, v. 3, p. 353-361, out-dez 2016.

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. Nature., n. 444, v. 7121, p. 860-867, dec 2006.

HU, Q.; LI, J.; NITTA, K.; KITADA, M.; NAGAI, T.; KANASAKI, K.; KOYA, D. FGFR1 is essential for N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline regulation of mitochondrial dynamics by upregulating microRNA let-7b-5p. **Biochem Biophys Res Commun.**, n. 495, v. 3, p. 2214-2220, jan 2018.

HUANG, Y.; SHEN, X.J.; ZOU, Q.; ZHAO, Q.L. Biological functions of microRNAs. **Bioorg Khim**., n.36, v. 6, p. 747-752, nov-dez 2010.

IRRCHER, I.; ADHIHETTY, P.J.; JOSEPH, A.M.; LJUBICIC, V.; HOOD, D.A. Regulation of mitochondrial biogenesis in muscle by endurance exercise. **Sports Med.**, n. 33, v. 11, p. 783-93, 2003.

JÄGER, S.; HANDSCHIN, C.; ST-PIERRE, J.; SPIEGELMAN, B. M. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle viadirect phosphorylation of PGC-1alpha. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, n. 104, v. 29, p. 12017–12022, jul 2007.

JOHNSON, C.D.; ESQUELA-KERSCHER, A.; STEFANI, G.; BYROM, M.; KELNAR, K.; OVCHARENKO, D.; WILSON, M.; WANG, X.; SHELTON, J.; SHINGARA, J.; CHIN, L.; BROWN, D.; SLACK, F.J. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in humans cells. **Cancer Res.**, n. 67, v. 16, p. 7713-7722, aug 2007.

JOHNSON, S.M.; GROSSHANS, H.; SHINGARA, J.; BYROM, M.; JARVIS, R.; CHENG, A.; LABOURIER, E.; REINERT, K.L.; BROWN, D.; SLACK, F.J. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. **Cell.**, n. 120, v. 5, p. 635-647, mar 2005.

JORDAN, S.D.; KRIEBS, A.; VAUGHAN, M.; DUGLAN, D.; FAN, W.; HENRIKSSON, E.; HUBER, A.L.; PAPP, S.J.; NGUYEN, M.; AFETIAN, M.; DOWNES, M.; YU, R.T.; KRALLI, A.; EVANS, R.M.; LAMIA, K.A. CRY1/2 Selectively Repress PPARδ and Limit Exercise Capacity. **Cell Metab.**, n. 26, v. 1, p. 243-255, jul 2017.

KANG, H.; KHANG, R.; HAM, S.; JEONG, G.R.; KIM, H.; JO, M.; LEE, B.D.; LEE, Y.I.; JO, A.; PARK, C.; KIM, H.; SEO, J.; PAEK, S.H.; LEE, Y.S.; CHOI, J.Y.; LEE, Y.; SHIN, J.H. Activation of the ATF2/CREB-PGC-1α pathway by metformin leads to dopaminergic neuroprotection. **Oncotarget**., n. 8, v. 30, p, 48603-48618, jul 2017.

KRAS, K.A.; LANGLAIS, P.R.; HOFFMAN, N.; ROUST, L.R.; BENJAMIN, T.R.; DE FILIPPIS, E.A.; DINU, V.; KATSANOS, C.S. Obesity modifies the stoichiometry of mitochondrial proteins in a way that is distinct to the subcellular localization of the mitochondria in skeletal muscle. **Metabolism**., [s.n], v. 89, p. 18-26, dez 2018.

KUPPUSAMY, K.T.; JONES, D.C.; SPERBER, H.; MADAN, A.; FISCHER, K.A.; RODRIGUEZ, M.L.; PABON, L.; ZHU, W.Z.; TULLOCH, N.L.; YANG, X.; SNIADECKI, N.J.; LAFLAMME, M.A.; RUZZO, W.L.; MURRY, C.E.; RUOHOLA-BAKER, H. Let-7 family of microRNA is required for maturation and adult-like metabolism in stem cell-derived cardiomyocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, n. 112, v. 21, p. 2785-2794, mai 2015.

KURAUTI, M.A.; COSTA-JÚNIOR, J.M.; FERREIRA, S.M.; SANTOS, G.J.; PROTZEK, A.O.; NARDELLI, T.R.; REZENDE, L.F.; BOSCHERO, A.C. Acute exercise restores insulin clearance in diet-induced obese mice. **J Endocrinol**, n.229, v. 3, p. 221-232, mar 2016.

LEE, R.C.; FEIMBAUM, R.L.; AMBROS, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell** , n.75, v. 5, p-843-854, 1993.

LEHMANN, S.M., KRUGER, C., PARK, B., DERKOW, K., ROSENBERGER, K., BAUMGART, J., TRIMBUCH, T.,EOM, G., HINZ, M., KAUL, D., HABBEL, P., KALIN, R., FRANZONI, E., RYBAK, A., NGUYEN, D., VEH,R., NINNEMANN, O., PETERS, O., NITSCH, R., HEPPNER, F.L., GOLENBOCK, D., SCHOTT, E., PLOEGH, H.L., WULCZYN, F.G., LEHNARDT, S. An unconventional role for miRNA:let-7 activates Tolllike receptor 7 and causes neurodegeneration. **Nat. Neurosci.** n.15, [sv], p. 827–835, 2012. LIESA, M.; SHIRIHAI, O.S. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutriente utilization and energy expenditure. **Cell Metab.**, n. 17, v. 4, p. 491-506, abr 2013.

LIMA, T.I., ARAUJO, H.N., MENEZES, E.S., SPONTON, C.H., ARAÚJO, M.B., BOMFIM, L.H., QUEIROZ, A.L., PASSOS, M.A., E SOUSA, T.A., HIRABARA, S.M., MARTINS, A.R., SAMPAIO, H.C., RODRIGUES, A., CURI, R., CARNEIRO, E.M., BOSCHERO, A.C., SILVEIRA, L.R. Role of microRNAs on the Regulation of Mitochondrial Biogenesis and Insulin Signaling in Skeletal Muscle. **J Cell Physiol.** n. 232, v. 5, mai 2017.

LIU, Y.; COLBY, J.K.; ZUO, X.; JAOUDE, J.; WEI, D.; SHUREIQI, I. The Role of PPAR-δ in Metabolism, Inflammation, and Cancer: Many Characters of a Critical Transcription Factor. **Int J Mol Sci.**, n. 19, v. 11, p. 1-14, out 2018.

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**., n. 25, v. 4, p. 402-408, dec 2001.

MAYR, C.; HEMANN, M.T.; BARTEL, D.P. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. **Science**., n. 315, v. 5818, p. 1576-1579, mar 2007.

MOORE, K.J.; RAYNER, K.J.; SUÁREZ, Y.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C. microRNAs and cholesterol metabolism. **Trends Endocrinol Metab.**, n. 21, v. 12, p. 699-706, dez 2010.

MOSS, E.G.; LEE, R.C.; AMBROS, V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in C. elegans and is regulated by the lin-4 RNA. **Cell**, n. 88, p. 637–646, 1997.

MOTTIS, A.; MOUCHIROUD, L.; AUWERX, J. Emerging roles of the corepressors NCoR1 and SMRT in homeostasis. **Genes Dev**., n. 27, v. 8, p. 819-835, abr 2013.

MOUCHIROUD, L.; EICHNER, L.J,.; SHAW, R.J.; AUWERX, J. Transcriptional coregulators: fine-tuning metabolismo. **Cell Metab**., n. 20, v. 1, . p. 26-40, jul 2014.

NARKAR, V.A.; DOWNES, M.; YU, R.T.; EMBLER, E.; WANG, Y.X.; BANAYO, E.; MIHAYLOVA, M.M.; NELSON, M.C.; ZOU, Y.; JUGUILON, H.; KANG, H.; SHAW, R.J.; EVANS, R.M. AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. **Cell.**, n. 134, v. 3, p. 405-415, aug 2008.

NARKAR, V.A.; FAN, W.; DOWNES, M.; YU, R.T.; JONKER, J.W.; ALAYNICK, W.A.; BANAYO, E.; KARUNASIRI, M.S.; LORCA, S.; EVANS, R.M. Exercise and PGC-1a-

independent synchronization of type I muscle metabolism and vasculature by ERRg. **Cell Metabolism**, n. 13, v. 3, p. 283-293, mar 2011.

NARUHN, S.; MEISSNER, W.; ADHIKARY, T.; KADDATZ, K.; KLEIN, T.; WATZER, B.; MULLER-BRUSSELBACH, S.; MULLER, R. 15-hydroxyeicosatetraenoic acid is a preferential peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist. **Mol. Pharmacol.**, n. 77, v.2, p. 171-184, nov 2010.

NELSON, M.E.; PARKER, B.L.; BURCHFIELD, J.G.; HOFFMAN, N.J.; NEEDHAM, E.J.; COOKE, K.C.; NAIM, T.; SYLOW, L.; LING, N.X.; FRANCIS, D.; NORRIS, D.M.; CHAUDHURI, R.; OAKHILL, J.S.; RICHTER, E.A.; LYNCH, G.S.; STÖCKLI, J.; JAMES, D.E. Phosphoproteomics reveals conserved exercise-stimulated signaling and AMPK regulation of store-operated calcium entry. **EMBO J.**, [s.n], [s.v], [s.p], 2019.

NEMATIAN, S.E.; MAMILLAPALLI, R.; KADAKIA, T.S.; MAJIDI-ZOLBIN, M.; MOUSTAFA, S.; TAYLOR, H.S. Systemic Inflammation Induces by microRNAS: Endometriosis-Derived Alteration in Circulating microRNA 125b-5p and Let-7b-5p Regulate Macrophage Cytokine Production. **J Clin Endocrinol Metab**., n. 103, v.1, p. 64-74, jan 2018.

NEMOTO, S.; FERGUSSON, M. M.; FINKEL, T. SIRT1functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1alpha. **J. Biol. Chem**. N.280, v. 16, p. 16456–16460, abr 2005.

O'CONNOR, R.S.; MILLS, S.T.; JONES, K.A.; HO, S.N.; PAVLATH, G.K. A combinatorial role for NFAT5 in both myoblast migration and differentiation during skeletal musclemyogenesis. **J Cell Sci.**, n. 120, v. 1, p. 149-159, jan 2007.

O'NEILL, H.M.; HOLLOWAY, G.P.; STEINBERG, G.R. AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: implications for obesity. **Mol Cell Endocrinol.**, n. 366, v. 2, p. 135-151, fev 2013.

PAULA, F.M.; LEITE, N.C.; VANZELA, E.C.; KURAUTI, M.A.; FREITAS-DIAS, R.; CARNEIRO, E.M.; BOSCHERO, A.C.; ZOPPI, C.C. Exercise increases pancreatic β -cell viability in a model of type 1 diabetes through IL-6 signaling. **FASEB J.**, n.29, v. 5, p. 1805-1816, mai 2015.

PISKOUNOVA, E.; POLYTARCHOU, C.; THORNTON, J.E.; LAPIERRE, R.J.; POTHOULAKIS, C.; HAGAN, J.P.; ILIOPOULOS, D.; GREGORY, R.I. Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms. **Cell.**, n. 147, v. 5, p. 1066-1079, nov 2011.

POLESSKAYA, A.; CUVELLIER, S.; NAGUIBNEVA, I.; DUQUET, A.; MOSS, E.G.; HAREL-BELLAN, A. Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency. **Genes Dev**., n. 21, v. 9, p. 1125-1138, mai 2007.

POTES, Y.; PÉREZ-MARTINEZ, Z.; BERMEJO-MILLO, J.C.; RUBIO-GONZALEZ, A.; FERNANDEZ-FERNÁNDEZ, M.; BERMUDEZ, M.; ARCHE, J.M.; SOLANO, J.J.; BOGA, J.A.; OLIVÁN, M.; CABALLERO, B.; VEGA-NAREDO, I.; COTO-MONTES, A. Overweight in the Elderly Induces a Switch in Energy Metabolism that Undermines Muscle Integrity. **Aging Dis.**, n. 10, v. 2, p. 217-230, abr 2019.

PUIGSERVER, P.; WU, Z.; PARK, C.W.; GRAVES, R.; WRIGHT, M.; SPIEGELMAN, B.M. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell.**, n. 92, v. 6, p. 829-839, mar 1998.

RADOM-AIZIK, S.; ZALDIVAR, F.; HADDAD, F.; COOPER, D.M. Impact of brief exercise on peripheral blood NK cell genes and microRNA expression in young adults. **J Appl Physiol (1985)**., n. 114, v. 5, p. 628-636, mar 2013.

REINHART, B.J.; SLACK, F.J.; BASSON, M.; PASQUINELLI, A.E.; BETTINGER, J.C.; ROUGVIE, A.E.; HORVITZ, H.R.; RUVKUN, G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. **Nature**., n. 403, v. 2000, p. 901-906, fev 2000.

ROCHA, M.; ROVIRA-LLOPIS, S.; BAÑULS, C.; BELLOD, L.; FALCON, R.; CASTELLO, R.; MORILLAS, C.; HERANCE, J.R.; HERNANDEZ-MIJARES, A.; VICTOR, V.M. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Insulin Resistance. **Curr Pharm Des.**, n. 13, v., 32, p. 5730-5741, 2013.

ROUSH, S.; SLACK, F.J. The let-7 family of microRNAs. **Trends Cell Biol.**, n 18, v. 10, p. 505-516, oct 2008.

SCARPULLA, R.C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function, **Physiol Rev**., n. 88, v. 6, p. 611-638, abr 2008.

SCHOLPA, N.E.; SCHNELLMANN, R.G. Mitochondrial-Based Therapeutics for the Treatment of Spinal Cord Injury: Mitochondrial Biogenesis as a Potential Pharmacological Target. **J Pharmacol Exp Ther.**, n. 363, v.3, p. 303-313, dez 2017.

SHEN, L.; CHEN, L.; ZHANG, S.; DU, J.; BAI, L.; ZHANG, Y.; JIANG, Y.; LI, X.; WANG, J.; ZHU, L. MicroRNA-27b Regulates Mitochondria Biogenesis in Myocytes. **PLoS One.**, n. 11, v. 2, p. 148532, fev 2016.

SHUREIQI, I.; JIANG, W.; ZUO, X.; WU, Y.; STIMMEL, J.B.; LEESNITZER, L.M.; MORRIS, J.S.; FAN, H.Z.; FISCHER, S.M.; LIPPMAN, S.M. The 15-lipoxygenase-1 product 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid down-regulates PPAR-delta to induce apoptosis in colorectal cancer cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n. 100, v. 17, p. 9968-9973, ago 2003.

SHYH-CHANG, N.; ZHU, H.; SOYSA T.Y; SHINODA, G.; SELIGSON, M.T.; TSANOV, K.M,; NGUYEN, L.; ASARA, J.M.; CANTLEY, L.C.; DALEY, G.Q. Lin28 enhances tissue repair by reprogramming cellular metabolism. **Cell**, n. 155, v. 4, p. 778-92, 2013.

SORIANO-ARROQUIA, A.; HOUSE, L.; TREGILGAS, L.; CANTY-LAIRD, E.; GOLJANEK-WHYSALL, K. The functional consequences of age-related changes in microRNA expression in skeletal muscle. **Biogerontology**, n. 17, v. 3, p. 641-654, jun 2016.

SPARKS, L.M.; XIE, H.; KOZA, R.A.; MYNATT, R.; HULVER, M.W.; BRAY, G.A.; SMITH, S.R. A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. **Diabetes**, n. 54, v. 7, p. 1926-1933, jul 2005.

ST-PIERRE, J.; LIN, J.; KRAUSS, S.; TARR, P.T.; YANG, R.; NEWGARD, C.B.; SPIEGELMAN, B.M. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coativators 1 alpha and 1beta (PGC-1alpha e PGC-1beta) in muscles cells. **J Biol Chem.**, n.278, v. 29, p. 26597-26603, jul 2003.

SU, J.L., CHEN, P.S.; JOHANSSON, G.; KUO, M.L. Function and regulation of let-7 family microRNAs. **Microrna**, n. 1, v.1, 2012.

SUNG, Y.; JEONG, J.; KANG, R.J.; CHOI, M.; PARK, S.; KWON, W.; LEE, J.; JANG, S.; PARK, S.J.; KIM, S.H.; YI, J.; CHOI, S.K.; LEE, M.H.; LIU, K.; DONG, Z.; RYOO, Z.Y.; KIM, M.O. Lin28a expression protects against streptozotocin-induced β -cell destruction and prevents diabetes in mice. **Cell Biochem Funct.**, n. 37, v. 3, p. 139-147, abr 2019.

VALERIO, A.; CARDILE, A.; COZZI, V.; BRACALE, R.; TEDESCO, L.; PISCONTI, A.; PALOMBA, L.; CANTONI, O.; CLEMENTI, E.; MONCADA, S.; CARRUBA, M.O.; NISOLI, E. TNF-alpha downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. **The Journal of clinical investigation**., n. 116, v. 10, p. 2791-2798, out 2006.

VIOLLET, B. The energy sensor AMPK: adaptation to exercise, nutritional and hormonal signals. In: Spiegelman B, editor. Hormones, Metabolism and the Benefits of Exercise [internet]. Chamcham: **Springer**; 2017.

VISWANATHAN, S.R.; DALEY, G.Q.; GREGORY, R.I. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. **Science**., n. 5872, v. 320, p. 97-100, apr 2008.

VISWANATHAN, S.R.; POWERS, J.T.; EINHORN, W.; HOSHIDA, Y.; NG, T.L.; TOFFANIN, S.; O'SULLIVAN, M.; LU, J.; PHILLIPS, L.A.; LOCKHART, V.L.; SHAH, S.P.; TANWAR, P.S.; MERMEL, C.H.; BEROUKHIM, R.; AZAM, M.; TEIXEIRA, J.; MEYERSON, M.; HUGHES, T.P.; LLOVET, J.M.; RADICH, J.; MULLIGHAN, C.G.; GOLUB, T.R.; SORENSEN, P.H.; DALEY, G.Q. Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. **Nat Genet.**, n. 41, v. 7, p. 843-848, jul 2009.

WANG, D.; LEGESSE-MILLER, A.; JOHNSON, E.L.; COLLER, H.A.Regulation of the let-7a-3 promoter by NF-κB. **PLoS One**., n. 7, v. 2, p. 31240, 2012.

WANG, H.; CHEN, Y.; MAO, X.; DU, M. Maternal obesity impairs fetal mitochondriogenesis and brown adipose tissue development partially via upregulation of miR-204-5p. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.**, n. 1865, v. 10, p. 2706-2715, out 2019.

WANG, L.; WEI, Y.; NING, C.; ZHANG, M.; FAN, P.; LEI, D.; DU, J.; GALE, M.; MA, Y.; YANG, Y. Ellagic acid promotes browning of white adipose tissues in high-fat diet-induced obesity in rats through suppressing white adipocyte maintaining genes. **Endocr J.**, [s.n.], [s.v], [s.p], jul 2019.

WANG, Q.; HU, J.; LIU, Y.; LI, J.; LIU, B.; LI, M.; LOU, S. Aerobic exercise improves synaptic-related proteins of diabetic rats by inhibiting foFOXO1/NF-kB/NRLP3 inflammatory signaling pathway and ameliorating PI3K/AKT Insulin Signaling Pathway. **J Mol Neurosci.**, [s.n], [s.v], [s.p], mai 2019.

XU, H.; LIU, C.; ZHANG, Y.; GUO, X.; LIU, Z.; LUO, Z.; CHANG, Y.; LIU, S.; SUN, Z.; WANG, X. Let-7b-5p regulates proliferation and apoptosis in multiple myeloma by targeting IGF1R. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)., n. 46. v. 11, p. 965-972, nov 2014.

XU, H.E.; LAMBERT, M.H.; MONTANA, V.G.; PARKS, D.J.; BLANCHARD, S.G.; BROWN, P.J.; STERNBACH, D.D.; LEHMANN, J.M.; WISELY, G.B.; WILLSON, T.M.; KLIEWER, S.A.; MILBURN, M.V. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. **Mol Cell.**, n. 3, v. 3, p. 397-403, mar 1999.

XU, Y., ZHAO, C.; SUN, X.; LIU, Z.; ZHANG, J. MicroRNA-761 regulates mitochondrial biogenesis in mouse skeletal muscle in response to exercise. **Biochem Biophys Res Commun.**, n. 467, v., p.103–108, 2015.

YAMAMOTO, H.; WILLIAMS, E.G.; MOUCHIROUD, L.; CANTÓ, C.; FAN, W.; DOWNES, M.; HÉLIGON, C.; BARISH, G.D.; DESVERGNE, B.; EVANS, R.M.; SCHOONJANS, K.; AUWERX, J. NCoR1 is conserverd physiological modulator of muscle massa and oxidative function. **Cell.**, n. 147, v. 4, p. 827-839, nov 2011.

YANG, Y.; DODBELE, S.; PARK, T.; GLASS, R.; BHAT, K.; SULMAN, E.P.; ZHANG, Y.; ABOUNADER, R. MicroRNA-29a inhibits glioblastoma stem cells and tumor growth by regulating the PDGF pathway. **J Neurooncol.**, [s.n], [s.v], [s.p], set 2019.

ZHANG, F.; CHEN, K.; TAO, H.; KANG, T.; XIONG, Q.; ZENG, Q.; LIU, Y.; JIANG, S.; CHEN, M. miR-25-3p, Positively Regulated by Transcription Factor AP-2α, Regulates the Metabolism of C2C12 Cells by Targeting Akt1. **Int J Mol Sci.**, n. 19, v. 3, [s.p.], mar 2018.

ZHANG, Y.; YIN, B.; SHU, B.; LIU, Z.; DING, H.; JIA, C. Differential expression of microRNA Let-7b-5p regulates burn-induced hyperglycemia. **Oncotarget**., n. 8, v. 42, p. 72886-72892, aug 2017.

ZHAO, Y.; LIU, Y.; LIN, L.; HUANG, Q.; HE, W.; ZHANG, S.; DONG, S.; WEN, Z.; RAO, J.; LIAO, W.; SHI, M. The lncRNA MACC1-1S1 promotes gastric cancer cell metabolic plasticity via AMPK/Lin28 mediated mRNA stability of MACC1. **Mol Cancer.**, n. 17, v. 1, p. 69, mar 2018.

ZHENG, S.; LIU, Q.; MA, R.; TAN, D.; SHEN, T.; ZHANG, X.; LU, X. Let-7b-5p inhibits proliferation and motility in squamous cell carcinoma cells through negative modulation of KIAA1377. **Cell Biol Int.**, n. 43. V. 6, p. 634-641, jun 2019.

ZHU, H.; SHYH-CHANG, N.; SEGRÈ, A.V.; SHINODA, G.; SHAH, S.P.; EINHORN, W.S.; TAKEUCHI, A.; ENGREITZ, J.M.; HAGAN, J.P.; KHARAS, M.G.; URBACH, A.; THORNTON, J.E.; TRIBOULET, R.; GREGORY, R.I.; DIAGRAM CONSORTIUM; MAGIC INVESTIGATORS; ALTSHULER, D.; DALEY, G.Q. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. **Cell.**, n. 147, v. 1, p. 81-94, sep 2011.

6. ANEXO I. Figuras suplementares



Figura 17. Suplementar 01. *Let-7b-5p* altera a concentração dos intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico e de lactato. A) Concentração de lactato, α -cetoglutarato, malato e oxaloacetato em células C2C12 transfectadas com *scramble, mimic* ou *antimir Let-7b-5p* (200 nM) por 48 h. *p≤0,05 vs controle. Análise estatística: Anova *One-way*, pós-teste Tukey.



Figura 18. Suplementar 02. Tratamento com ácido palmítico não altera expressão de *Let-7b-5p* em C2C12. Expressão dos genes inflamatórios TNF α , IkB α e do miRNA *Let-7b-5p* em 6, 12, 24 e 36h de tratamento com ácido palmítico (500 μ M). *p \leq 0,05 vs controle. Análise estatística: Anova *One-way*, pós-teste Tukey.



Figura 19. Suplementar 03. Expressão gênica de Lin28a em resposta a miméticos de exercício físico em C2C12. A) Expressão gênica de PDK4 e Lin28a em células primárias tratadas por 1, 3, 12 e 24h com GW501516 (100 nM). B) Expressão da proteína Lin28a em células musculares C2C12 tratadas por 12h com GW501516m(100 nM). Ct: controle GW: GW501516. *p \leq 0,05 vs controle. Análise estatística: *Test t de Student* não pareado.



Figura 20. Suplementar 04. Co-repressor ou co-ativador de PPARβ modulam a expressão de LIN28a. A) Expressão gênica de NCoR1, PDK4 e LIN28a em células MEF transfectadas com NCoR1 (1µg). B) Expressão da proteína Lin28a em células transfectadas com pCDNA, NCoR1 e PGC1α. C) Densitometria da proteína LIN28a em células transfectadas transfectadas pCDNA, NCoR1(1 µg) e PGC1α (1 µg) por 48 h. Vazio: vetor sem inserto; NcoR1: vetor com inserto do gene NcoR1; PGC1α: vetor com inserto do gene PGC1α.*p ≤0,05 vs controle. A) *Test t de Student* não pareado. B) Anova *One-way*, pós-teste Tukey.

7. ANEXO II. Comissão Ètica no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada <u>CONTROLE DA BIOGÊNESE MITOCONDRIAL E RESPOSTA A</u> <u>INSULINA POR miRNA</u>, registrada com o nº <u>4694-1/2017</u>, sob a responsabilidade de <u>Prof. Dr. Leonardo</u> <u>dos Reis Silveira e Hygor Nunes Araujo</u>, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em <u>19 de outubro de 2017</u>.

| Finalidade: | () Ensino (X) Pesquisa Científica | | |
|---|-------------------------------------|--|--|
| Vigência do projeto: | 10/12/2017-03/08/2019 | | |
| Vigência da autorização para manipulação animal: | 10/12/2017-03/08/2019 | | |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib | | |
| No. de animais: | 30 | | |
| Idade/Peso: | 28 dias/ 15g | | |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib | | |
| No. de animais: | 24 | | |
| Idade/Peso: | 30 dias / 15g | | |
| Sexo: | machos | | |
| Origem: | CEMIB/UNICAMP | | |

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 19 de outubro de 2017.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro Presidente

Fátima Alonso Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 días após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

8. ANEXO IV. Direito autoral

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para a publicação em revista ciêntíficas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam na minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Controle molecular da função mitocondrial pelo miRNA** *Let-7b-5p*, não infringem os dispositivos da Lei n.º9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 30 de agosto de 2019.

Assinatura: Huger Numer Circayo

Nome do autor: Hygor Nunes Araujo

RG n.°: 36.917.200-0

Jaouso Assinatura:

Nome do orientador: **Leonardo dos Reis Silveira** RG n.º 5.654.810 13