



Instituto de
Biociências



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



PG-BGA

**“EXPRESSÃO DE FATORES MIOGÊNICOS E DE
microRNAs NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS
SUBMETIDOS A ESTÍMULO ATRÓFICO E RECUPERAÇÃO
POR TREINAMENTO FÍSICO”**

Raquel Santilone Bertaglia de Almeida

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração Biologia Celular Estrutural
e Funcional.

Orientadora: Dra Maeli Dal Pai

BOTUCATU – SP

2015



Instituto de
Biociências



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**“EXPRESSÃO DE FATORES MIOGÊNICOS E DE
microRNAs NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS
SUBMETIDOS A ESTÍMULO ATRÓFICO E RECUPERAÇÃO
POR TREINAMENTO FÍSICO”**

Raquel Santilone Bertaglia de Almeida

Orientadora: Dra Maeli Dal Pai

Co-Orientador: Dr Robson Francisco Carvalho

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

**BOTUCATU – SP
2015**



Instituto de
Biociências



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



PG-BGA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Almeida, Raquel Santilone Bertaglia de.

Expressão de fatores miogênicos e de microRNAs no
músculo esquelético de ratos submetidos a estímulo
atrófico e recuperação por treinamento físico / Raquel
Santilone Bertaglia de Almeida. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Maeli Dal Pai

Coorientador: Robson Francisco Carvalho

Capes: 20703007

1. Atrofia muscular. 2. Aptidão física. 3. Sistema
musculoesquelético. 4. Sequenciamento de nucleotídeo. 5.
Expressão gênica

Palavras-chave: Atrofia muscular; MRFs; Músculo estriado
esquelético; Recuperação muscular; miRNAs.



Instituto de
Biociências



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



PG-BGA

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu marido Osvaldo Cesar que me faz feliz e renova minha esperança a cada dia.



Instituto de
Biociências



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



PG-BGA

Agradecimentos

À minha querida orientadora, mestre e amiga Dra. Maeli Dal Pai, pela competência, paciência e carinho com que acompanhou todas as etapas desse trabalho e por ser um grande exemplo profissional.

Ao meu marido Osvaldo Cesar pelo companheirismo, paciência e amor. Seu incentivo foi essencial para que eu pudesse trilhar esse caminho até o fim.

Aos meus pais, referências de sabedoria, integridade e perseverança. Obrigada por acreditarem que o conhecimento é a melhor herança e por me apoiarem em todos os momentos da minha vida pessoal e profissional.

Aos meus irmãos Daniel e Angélica por todo amor, carinho e amizade, e por permanecerem sempre ao meu lado, nos bons e maus momentos. Vocês são motivos de muito orgulho e inspiração.

Aos meus familiares e amigos pela grande ajuda nos momentos de dificuldade e compreensão nos momentos que estive ausente.

Aos membros da banca de defesa: Dr. Silvio Assis Oliveira Junior, Dra Francis Lopes Pacagnelli, Dr. Thiago Luiz de Russo, Dr. Renato Ferretti e Dra. Maeli Dal Pai Silva pela disponibilidade e atenção para participarem desta avaliação.

Aos Professores Dr. Renato Ferretti, Dra. Maeli Dal Pai, e Dra. Márcia Gallacci, por comporem minha banca de qualificação do doutorado, pela atenção, sugestões e principalmente pelos ensinamentos transmitidos.

Aos meus amigos e amigas, do Laboratório de Biologia do Músculo Esquelético (LBME), que fortaleceram os laços da igualdade, num ambiente fraterno e respeitoso, e pelo convívio agradável, conhecimento compartilhado e constante apoio.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada que participaram, positivamente, na minha formação científica durante estes quatro anos de doutorado, agradece pelos ensinamentos e por compartilharem suas experiências profissionais.



Instituto de
Biociências



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



PG-BGA

Aos técnicos de laboratório, José Eduardo, Vivian, Keila e Ricardo pelo auxílio profissional e amizade.

Aos funcionários do departamento de Morfologia-IBB-UNESP-Botucatu por serem prestativos e estarem sempre presentes.

À Luciana, secretária do Departamento de Morfologia-IBB-UNESP-Botucatu, pela atenção e por todo auxílio.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação pelo profissionalismo e pela disposição em sempre querer ajudar.

À FAPES pelo suporte financeiro, viabilizando o desenvolvimento desse trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho.

Por final, à aquele, que me permitiu tudo isso, ao longo de toda a minha vida, e, não somente nestes anos de pós graduação, à você meu DEUS, por guiar meus passos e iluminar meu caminho.

Muito obrigada!

Sumário

LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABELAS	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
I - INTRODUÇÃO	1
II - JUSTIFICATIVA.....	7
III – OBJETIVO GERAIS	8
IV – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
V - METODOLOGIA	8
Animais e Protocolo Experimental	8
Imobilização dos membros posteriores	9
Protocolo do treinamento aeróbico	11
Protocolo do treinamento resistido.....	11
Dados Anatômicos	12
Análise Histoquímica e Área de secção transversal (AST) das fibras musculares.....	12
Análise bioquímica da Cadeia Pesada das Miosinas (MyHC)	13
Avaliação da expressão gênica dos RNA mensageiros (mRNAs) e dos microRNAs (miRNAs)	13
Análise Estatística	17
VI - RESULTADOS	17
VII - DISCUSSÃO	36
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
IX - MANUSCRITO.....	58

Lista de Figuras

	Página
Figura 1 - Imagem representativa da Imobilização dos membros inferiores dos animais dos grupos Imobilizado (I), Recuperado 3 e 7 dias (R3 e R7) e Treinados 3 e 7 dias (T3 e T7).	10
Figura 2 - Imagem representativa do treinamento aeróbico com carga dos animais dos grupos T3 e T7.	11
Figura 3 - Imagem representativa do treinamento resistido com carga dos animais dos grupos TF3 e TF7.	12
Figura 4 - Relação peso dos músculos sóleo e plantar pelo comprimento da tibia (Sol/Tb e Pl/Tb) entre os grupos Controle (C) X Imobilizado (I); Controle 3 dias (C3) X Recuperado 3 dias (R3) X Treinado 3 dias (T3) X Treinado Força 3 dias (TF3); Controle 7 dias (C7) X Recuperado 7 dias (R7) X Treinado 7 dias (T7) X Treinado Força 7 dias (TF7);.	18
Figura 5 - Corte transversal do músculo sóleo. Imagens representativas dos grupos Imobilizado (A) e Controle (B) em Coloração HE. Fibra muscular (F), perimísio (seta contínua), endomísio (seta descontinua) e mionúcleo (ponta da seta). Barra 20µm	19
Figura 6 - Corte transversal do músculo plantar. Imagens representativas dos grupos Imobilizado (A) e Controle (B) em Coloração HE. Fibra muscular (F), perimísio (seta contínua), endomísio (seta descontinua) e mionúcleo (ponta da seta). Barra 20µm.	19
Figura 7 - Cortes transversais seriados dos músculos plantar (A, B e C) e sóleo (D) de um animal representativo do grupo controle. Análise histoquímica da ATPase miofibrilar (mATPase) em pH 4,1 (A), 4,5 (B), 10,6 (C) e 4,1 (D). Fibras musculares tipo I, IC/IIC, IIA IID e IIB.	20
Figura 8 - Porcentagem relativa da frequência dos tipos de fibra do músculo sóleo e plantar nos grupos C: Controle e I: Imobilizado.	21
Figura 9 - Porcentagem relativa da frequência dos tipos de fibras dos músculos sóleo e plantar nos grupos C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias, T7: Treinado 7 dias e TF7: Treinado Força 7 dias.	22
Figura 10 - Área de secção transversal (AST) dos tipos de fibra nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle e I: Imobilizado.	23
Figura 11 - Área de secção transversal (AST) dos tipos de fibra nos músculos sóleo e plantar dos grupos C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias.	24
Figura 12 - Imagem representativa da separação eletroforética (SDS-PAGE) das isoformas de MyHC do músculo sóleo (A) e plantar (B) no Grupo C.	24
Figura 13 - Níveis da expressão do mRNA do MAFbx expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias.	25
Figura 14 - Níveis da expressão do mRNA do MuRF1 expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias.	26
Figura 15 - Níveis da expressão do mRNA da Miostatina expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias.	26

Figura 16 -	Níveis da expressão do mRNA do FOXO3 expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias.	27
Figura 17 -	Níveis da expressão do mRNA do FOXO1 expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias.	27
Figura 18 -	Níveis da expressão do mRNA de 4E-BP1 expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias.	28
Figura 19 -	Níveis da expressão do mRNA do PGC1-alfa (PGC-1 α) expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias.	29
Figura 20 -	Níveis da expressão do mRNA de MyoD expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias.	29
Figura 21 -	Níveis da expressão do mRNA de Miogenina expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias.	30
Figura 22 -	Níveis da expressão do mRNA do IGF-1 expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias.	30
Figura 23 -	Níveis da expressão do miR-1 expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias.	31
Figura 24 -	Níveis da expressão do miR-23a expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias.	32
Figura 25 -	Níveis da expressão do miR-128 expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias.	33
Figura 26 -	Níveis da expressão do miR-133a expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias.	33

Figura 27 - Níveis da expressão do miR-206 expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias. 34

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Primers utilizados para RT-qPCR	Página 15
Tabela 2 -	Ensaio TaqMan® utilizados para amplificação por RT-qPCR.	17
Tabela 3 -	Resumo dos principais resultados obtidos para o músculo sóleo e plantar.	35

RESUMO

O entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos com os processos de hipertrofia e atrofia muscular têm sido alvo de muitas pesquisas. Tal fato contribui para desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes para atenuar ou até mesmo bloquear a perda de massa muscular. Neste contexto, fatores miogênicos e microRNAs (miRNAs) têm sido estudados para melhor compreender as respostas adaptativas do músculo esquelético. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar as adaptações morfofuncionais, a expressão gênica de fatores miogênicos, anabólicos e catabólicos e a expressão dos miRNAs no músculo esquelético de ratos submetidos à estímulo atrofico, seguido de treinamento físico, aeróbico e resistido. Foram utilizados 80 ratos *Wistar* machos (80 dias, 250 a 300 g), divididos em 10 grupos (n=8): C: controle; I: imobilizado; C3: controle 3 dias; R3: recuperado sem exercício 3 dias; T3: treinamento aeróbico 3 dias; TF3: treinamento de força 3 dias; C7: controle 7 dias; R7: recuperado sem exercício 7 dias; T7: treinamento aeróbico 7 dias e TF7: treinamento de força 7 dias. Inicialmente, os animais dos grupos I, R3, R7, T3, T7, TF3 e TF7 foram submetidos a um período de 7 dias de imobilização dos membros posteriores. Foram analisados os músculos plantar (Pl - glicolítico e de contração rápida) e sóleo (Sol - oxidativo e de contração lenta). A atrofia muscular foi confirmada pela análise da área de secção transversal (AST) das fibras nos animais dos grupos I e C. Os grupos T3 e T7, foram submetidos a um programa de recuperação muscular com exercício aeróbico (natação) no período de 3 e 7 dias respectivamente enquanto os grupos TF3 e TF7 foram submetidos a um programa de recuperação muscular com exercício resistido (salto). Ao término do experimento os músculos Pl e Sol foram submetidos às análises: morfológica, histoquímica, bioquímica e molecular. Observamos atrofia muscular em ambos os músculos, após a imobilização, porém, após 7 dias de recuperação, apenas o grupo T7 apresentou recuperação na AST. Os dados de expressão gênica mostraram: aumento dos genes envolvidos com a atrofia muscular no grupo I tanto no músculo Sol (MAFbx, PGC-1 α e 4E-BP1), quanto no Pl (MuRF1, MAFbx, PGC-1 α e 4E-BP1); diminuição de FOXO3 e aumento de IGF-1, no músculo Sol, no grupo I; diminuição na expressão de miRNAs nos músculos

Sol (miR-1, miR-23a, miR-128, miR-133a e miR-206) e Pl (miR-23a e miR-133a). Após 3 dias de recuperação muscular, observamos: aumento na expressão de MyoD e Miogenina nos grupos T3 e TF3; diminuição na expressão do miR-1 e miR-206 no grupo R3 e do miR-23a, miR-128 e miR-133a nos grupos R3, T3 e TF3 no músculo Sol e do miR-133a nos grupos T3 e TF3 no Pl. Após 7 dias de recuperação observamos: aumentado de Miogenina no grupo R7 no músculo Sol, diminuição na expressão de miR-23a e miR-133a nos grupos R3, T3 e TF3 e de miR-128 nos grupo T3 e TF3 no músculo Sol, e diminuição de miR-133a nos grupos R7 e T7 no músculo Pl. Nossos achados mostraram que: a imobilização por 7 dias induziu a atrofia nos músculos Sol e Pl, sendo mais acentuada nas fibras glicolíticas do músculo Pl; o treinamento aeróbico acelerou o processo de recuperação muscular e regulou a expressão dos miR-1/-206 durante a recuperação do músculo Sol, possivelmente através da ação dos MRFs; os treinamentos aeróbico e resistido não alteraram a recuperação da massa muscular, nem a expressão de genes relacionados com a regeneração muscular no músculo Pl.

ABSTRACT

Understanding the cellular and molecular mechanisms involved in hypertrophy and atrophy processes have been the subject of much research. This fact contributes to development of effective therapeutic strategies to attenuate/block the muscle mass loss. However, myogenic factors and muscle-specific miRNAs have been studied to understand the skeletal muscle adaptive responses. The aim of this study were to evaluate the morphological and functional adaptations, the gene expression of myogenic, anabolic and catabolic factor, and the expression of microRNAs in skeletal muscle of rats submitted to atrophic stimulus followed by physical training. 80 male Wistar rats were used (80 days 250 to 300 g) were divided into 10 groups (n = 8) C: Control; IM: immobilized; C3: control 3 days; R3: recovered without exercise 3 days; T3: aerobic training 3 days; TF3: strength training 3 days; C7: control 7 days; R7: recovered without exercise 7 days; T7: aerobic training 7 days and TF7: strength training 7 days. Initially, the animals of I, R3, R7, T3, T7, TF3 and TF7 groups were underwent period of hindlimb immobilization by 7 day. Plantaris (Pl - glycolytic and fast twitch) and soleus (Sol - oxidative and slow twitch) muscles were analyzed. Muscle atrophy was confirmed by the analysis of cross-sectional area (CSA) of fibers in groups I and C. The T3 and T7 groups, were underwent a muscle recovery program with aerobic exercise (swimming) 3 period and 7 days respectively while the TF3 and TF7 groups were underwent a muscle recovery program with resistance exercise (jump). At the end of experiment the Pl and Sol muscles were submitted to analysis: morphological, immunohistochemical, biochemical and molecular. Muscle atrophy was observed in both muscles after immobilization, but after 7 days of recovery, only the T7 group showed recovery in CSA. Gene expression data showed: increase in genes involved in muscle atrophy in group I in Sol (MAFbx, PGC-1 α and 4E-BP1) and Pl muscles (MuRF1, MAFbx, PGC-1 α and 4E-BP1) ; FOXO3 decrease and IGF-1 increase in Sol muscle in group I; microRNAs decrease in Sol (miR-1, miR-23a, miR-128, miR-133a and miR-206) and Pl muscles (miR-23a and miR-133a). After 3 days of muscle recovery, observed: expression of MyoD and Myogenin increased in T3 and TF3 groups; miR-1 and miR-206 decreased in the R3 group and

miR-23a, miR-128 and miR-133a reduced in R3, T3 and TF3 groups in Sol muscle, and miR-133a in groups T3 and TF3 in Pl muscle. After 7 days of muscle recovery observed: Myogenin increased in R7 group in Sol muscle, miR-23a and miR-133a decreased in R3, T3 and TF3 groups and miR-128 in T3 and TF3 groups in Sol muscle, and miR-133a reduced in R7 and T7 groups. Our findings showed that: immobilization By 7 days induced atrophy in Sol and Pl muscles, being more pronounced in glycolytic fibers of the Pl muscle; aerobic training accelerates the process of muscle recovery and regulates the miR-1 / -206 expression during Sol muscle recovery, probably through the MRFs action; both exercise programs did not change the muscle mass recovery, or the genes expression associated with muscle regeneration in the Pl muscle.

INTRODUÇÃO

O músculo estriado esquelético é um tecido constituído por células especializadas e multinucleadas, as fibras musculares. A disposição altamente organizada dos diferentes tipos de fibras musculares confere a este tecido uma ampla diversidade estrutural, metabólica e funcional (Schiaffino e Reggiani, 1994; Pette e Staron, 2000).

Morfológicamente, as fibras musculares são constituídas por unidades contráteis repetidas, os sarcômeros. Cada sarcômero é formado por várias proteínas, das quais se destacam as proteínas contráteis miosina (filamento grosso) e actina (filamento fino, associado às proteínas reguladoras troponina e tropomiosina) (Huxley, 1969). A contração muscular ocorre através da interação entre actina e a porção globular da molécula de miosina, do sarcômero, após a hidrólise do ATP, pela ATPase miofibrilar (mATPase) (Lowey *et al.*, 1969).

A velocidade de contração de um músculo é diretamente proporcional a atividade da mATPase (Talmadge e Roy, 1993). Este evento foi demonstrado em análises de fibras isoladas, que revelaram uma alta correlação entre o tipo de fibra, baseado na atividade da mATPase, com a especificidade da cadeia pesada da miosina, do inglês myosin heavy chain (MyHC) (Barany, 1967; Pette e Staron, 2000). A MyHC capaz de rápida hidrólise do ATP é característica das fibras do tipo II, que são fibras de contração rápida. Já a MyHC de lenta hidrólise do ATP é encontrada nas fibras do tipo I, de contração lenta (Kelly e Rubinstein, 1994).

Neste contexto, Pette e Staron (2001) classificaram os tipos de fibras musculares em fibras de contração lenta – Tipo I (slow fibers), expressando MyHCI e de contração rápida Tipo II (fast fibers), subdivididas em tipo IIA, expressando MyHCIIa, tipo IID expressando MyHCIIId e tipo IIB expressando MyHCIIb.

As fibras do tipo I, IIA, IID e IIB são classificadas como fibras puras, pois expressam uma única isoforma de MyHC. Porém, além das fibras puras, existem as fibras “híbridas”, que expressam duas ou mais isoformas de MyHC. Estas fibras foram classificadas em Tipo IC (MyHCI

> MyHCIIa), tipo IIC (MyHCIIa > MyHCI), tipo IIAD (MyHCIIa > MyHCIIId), tipo IIDA (MyHCIIId > MyHCIIa), tipo IIDB (MyHCIIId > MyHCIIb) e tipo IIBD (MyHCIIb > MyHCIIId) (Pette e Staron, 2000; Pette e Staron, 2001).

O músculo esquelético é um tecido altamente plástico e é capaz de alterar suas características morfológicas, estruturais e fenotípicas para suprir as demandas metabólicas e funcionais, em resposta a estímulos que modifiquem a atividade contrátil (exercício aeróbico, estimulação elétrica, desnervação e envelhecimento), a carga no músculo (exercício resistido e microgravidade) e o fornecimento de substrato (intervenção nutricional) (Pette e Staron, 2000; Magaúda *et al.*, 2004). Uma das principais características da plasticidade muscular é a regulação intrínseca da transcrição de genes envolvidos com a síntese protéica (promovendo um aumento da massa muscular – hipertrofia) ou com a degradação protéica (promovendo redução da massa muscular- atrofia) (Matsakas *et al.*, 2005; Baar *et al.*, 2006).

Estudos demonstram que situações de desuso decorrentes de modelos experimentais (imobilização, suspensão do membro posterior, desnervação, repouso no leito e tenotomia), de processos fisiológicos (envelhecimento) e de patologias (câncer, doenças neuromusculares, insuficiência respiratória e sepsia) podem conduzir a severa atrofia muscular (Machida e Booth, 2004). Por outro lado, tem sido demonstrado que alguns programas de treinamento podem modular o grau de síntese e degradação das proteínas miofibrilares e, potencialmente, promover a recuperação da massa muscular (Campos *et al.*, 2002, Kadi *et al.*, 2000).

Programas de treinamento podem gerar sobrecarga progressiva no tecido muscular e, potencialmente, promover a ativação das células satélites (CS). As CS são precursores miogênicos indiferenciados, responsáveis pelo crescimento muscular pós-natal, porém, no músculo adulto permanecem mitoticamente quiescentes, e em resposta a miotraumas severos (como a ação de toxinas ou distrofia muscular) ou miotraumas adaptativos (como o exercício resistido), se proliferam e migram para a região danificada e fundem-se na fibra muscular pré-existente,

contribuindo para a regeneração das fibras musculares danificadas promovendo assim a hipertrofia muscular (Deasy *et al.*, 2001 Hawke e Garry, 2001).

O treinamento resistido tem sido divulgado como um potente estímulo, capaz de promover a hipertrofia, força e potência muscular, além de induzir à modulação dos tipos de fibras e das isoformas de MyHC do tipo MyHCIIb para MyHCIIa (Campos *et al.*, 2002; Bickel *et al.*, 2005). Por outro lado, o treinamento aeróbico conduz a pequenas mudanças na massa muscular, entretanto, promove o aumento do número de mitocôndrias, da atividade das enzimas do metabolismo oxidativo (Hawley, 2002) e da captação de oxigênio em exercício submáximo (Trappe *et al.*, 2006).

Embora estas adaptações musculares ao exercício físico estejam bem descritas, as vias de sinalização envolvidas com estes ajustes e/ou adaptações em resposta ao exercício não estão bem esclarecidos. A magnitude e especificidade das mudanças no perfil fenotípico muscular aos diversos modelos e protocolos de exercício/treinamento físico, são dependentes de alterações na expressão de genes músculo-específicos, controlados pela ativação e/ou repressão das vias intracelulares envolvidas com a ativação de fatores transcricionais que levam a expressão de genes musculares (Egan e Zierath, 2013).

Os fatores transcricionais da família MyoD (Fatores reguladores miogênicos - MRFs) como a MyoD, Miogenina, Myf5 e o MRF4, são encontrados na região regulatória de genes músculo específico (Murre *et al.* 1989), incluindo os estruturais e os envolvidos com a formação das proteínas dos sarcômeros (Lin *et al.* 1991; Li e Capetanaki 1993; Wheeler *et al.* 1999). Os MRFs podem contribuir na regulação da massa muscular controlando a taxa de síntese proteica. Os MRFs também estão envolvidos com a proliferação e a diferenciação das células satélites, que quando ativadas proliferam, se diferenciam e fundem-se às fibras musculares existentes promovendo a regeneração muscular (Rosenblatt *et al.* 1994; Lowe e Alway 1999). A MyoD é mais expressa durante a proliferação enquanto que a Miogenina é expressa em maior grau, durante o processo de diferenciação celular (Megeney e Rudnicki, 1995; Rudnicki e Jaenisch, 1995).

No músculo adulto, os MRFs são expressos pelas CS de maneira semelhante ao que ocorre na miogênese: após a ativação estas proliferam para formar uma nova população de mioblastos que se diferenciam e podem contribuir para a regeneração e hipertrofia muscular, em resposta a um MA (Deasy *et al.*, 2001).

A ativação das CS durante a hipertrofia pode ser influenciado ainda, pela expressão de fatores de crescimento, dentre eles o fator de crescimento semelhante à insulina 1, (IGF-1) e a Miostatina. Estes podem atuar como reguladores positivos (IGF-1) ou negativos (Miostatina) no processo de hipertrofia (Chargé e Rudnicki, 2004) e têm sido descritos como importantes mediadores do crescimento e da homeostase muscular (Walsh e Celeste, 2005; Heinemeier *et al.*, 2007; Federeck e Rupert, 2008).

O IGF-1 tem sido descrito como um potente sinal anabólico no tecido muscular, estimulando a síntese protéica em diferentes condições fisiológicas (Barton-Davis *et al.*, 1999; Glass, 2003; Goldspink, 2005), promovendo significativa hipertrofia e aumento da produção de força (Barton-Davis *et al.*, 1998). Adicionalmente, o IGF-1 reduz a resposta inflamatória e facilita a regeneração e reparação do músculo esquelético (Hawke e Garry, 2001). Contudo, o efeito anabólico do IGF-1 pode ser potencializado pela carga mecânica no treinamento resistido (Burke *et al.*, 2008) e o aumento da expressão do IGF-1 após treinamento de força estimula a proliferação, a diferenciação e a fusão das CS nos miotúbulos em crescimento (Goldspink, 1995).

A importância do IGF-1 na promoção da hipertrofia muscular foi demonstrada em estudos que monitoraram o aumento da expressão do IGF-1 em associação com o aumento da massa muscular (Goldspink *et al.*, 1995; Phelan e Gonyea 1997). Quando liberado, o IGF-1 desencadeia uma cascata de eventos intracelulares, por meio da via IRS (insulin-receptor substrate) →PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) →AKT (serine/threonine kinase) →Mtor (mammalian target of rapamycin) →p70S6K (p70 S6 kinase), que promove aumento da síntese protéica.

Em contraste ao IGF-1, a Miostatina (MSTN), um membro da família do TGF- β também conhecida como fator de crescimento e diferenciação 8 (GDF8), é caracterizada como um potente

regulador negativo do crescimento muscular (Walsh e Celest, 2005; Federeck e Rupert, 2008). Além da ação inibitória sobre a ativação das CS, a MSTN pode inibir a atuação de fatores transcricionais, assim como a MyoD e a Miogenina (Durieux *et al.*, 2007) e promover proteólise por meio de regulação de alguns componentes do sistema ubiquitina-proteossoma (Gilson *et al.*, 2007) favorecendo a atrofia muscular.

A atrofia muscular é um processo onde ocorre um aumento da degradação de proteínas e alteração do *turnover* proteico muscular, e diferentes vias de transcrição são ativadas. Além da Miostatina, destacam-se os genes do *Muscle Ring Finger-1* (MuRF1) e *Muscle Atrophy Fbox* (MAFbx / Atrogina-1) que estão aumentados em diferentes modelos de atrofia, inclusive em músculos submetidos a períodos de imobilização, e estão relacionados com a via ubiquitina-proteossoma (Gomes *et al.*, 2001; Glass, 2005). Dessa forma, o aumento na expressão de MAFbx e MuRF1 em modelos de imobilização estão associadas com aumentos da atividade do sistema de proteólise, mas não com a inibição da síntese de proteínas (Krawiec *et al.*, 2005).

Alvos bem estabelecidos de MAFbx e MuRF1 são as E3 ligases, enzimas que conferem a especificidade da ligação entre a ubiquitina e o substrato que será degradado pelo proteossoma (Glickman e Ciechanover, 2002). Porém, alguns estudos sugerem um papel do MAFbx na regulação da proliferação e diferenciação de mioblastos, onde a superexpressão de MAFbx resulta na poliubiquitização de MyoD e Miogenina inibindo a proliferação e diferenciação de CS, consequentemente impedindo a formação de miotubos (Lagirand *et al.*, 2009; Jogo *et al.*, 2009).

Em contraste com o MAFbx, o MuRF1 interage preferencialmente com proteínas estruturais, mediando a sinalização da Tinina (Centner *et al.*, 2001) ou ainda estimulando a degradação das MyHCs (Cohen *et al.*, 2009; Fielitz *et al.*, 2007), além de interagir com várias proteínas associadas com a produção de glicose e o metabolismo do glicogênio (Hirner *et al.*, 2008).

A regulação da transcrição de MAFbx e MuRF1 em ratos ocorre por meio da família de fatores de transcrição *Forkhead Box Protein O* (FOXO) (Sandri *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004). FOXO1 não aumenta diretamente os níveis de MAFbx ou MuRF1 mas bloqueia a via do IGF-1/Akt

(Stitt *et al.*, 2004). FOXO3 se liga diretamente ao promotor do MAFbx para aumentar sua transcrição (Sandri *et al.*, 2004). Além disso, a atividade do FOXO pode ser modulada pela interação com outros fatores transcricionais como o PGC-1 α (Peroxisome Proliferative Activated Receptor- γ Coactivator 1 α), um cofator essencial para a biogênese mitocondrial (Lin *et al.*, 2002; Puigserver *et al.*, 2003).

Além disso, a perda de massa muscular induzida por suspensão do membro posterior está associada com um aumento da formação no complexo 4E-BP1 / eIF4E (Bodine *et al.*, 2001). O Fator Iniciador Eucarioto 4E Proteína Ligase 1 (4E-BP1) inibe a eIF-4E, que quando ativada, se liga a eIF-4G, formando um complexo conhecido como eIF-4F, que é necessário para montagem do ribossomo e consequentemente para a transcrição. Dessa forma, quando o 4E-BP1 está ativo, inibe o processo de tradução (Miyazaki e Esser, 2009; Glass, 2005; Bonaldo e Sandri, 2013).

Os processos de atrofia e hipertrofia muscular, bem como o controle do fenótipo das fibras musculares também são controladas pelos microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs reguladores não codificantes, com tamanho variando de 17 a 25 nucleotídeos (Ambros *et al.*, 2003). Os miRNAs reprimem pós-transcricionalmente a expressão gênica pelo reconhecimento de locais complementares na região 3' não traduzida (3' UTR) de seus RNAs mensageiros (mRNAs) alvo. Acredita-se que cada miRNA possa se ligar a muitos mRNAs, os quais podem ter sua estabilidade ou tradução regulada por mais de um miRNA (Doench e Sharp, 2004). Os alvos de miRNAs reguladores parecem trabalhar de forma orquestrada para controlar uma via ou função biológica comum (Esau *et al.*, 2006; Leung e Sharp, 2007).

Os myomiRs são miRNAs músculo-específicos, (miR-1, -133, -206, -208, -208b e -499) envolvidos em uma série de processos incluindo miogênese (proliferação, diferenciação e especificação do tipo de fibra), regeneração e hipertrofia das fibras musculares (Chen *et al.*, 2006; Flynt *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006; McCarthy *et al.*, 2007; Naguibneva *et al.*, 2006; Sayed *et al.*, 2007; van Rooij *et al.*, 2007). A alta expressão do miR-1 ou miR-206 promove a diferenciação de mioblastos e/ou CS pela inibição da expressão protéica do Pax 7, um marcador de célula satélite

quiescente (Chen *et al.*, 2006; 2010). A alta expressão do miR-133 estimula a proliferação dessas células, mas reprime sua diferenciação (Chen *et al.*, 2006).

Além dos myomiRs, miR-128 também está envolvido com a miogênese, reprimindo a proliferação de mioblastos com diminuição de proteínas da via do IGF-1 (IRS1 e Akt) (Chen *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2010; Motohashi *et al.*, 2013) e o miR-23a foi descrito como regulador da atrofia muscular, suprimindo a tradução de MAFbx e MuRF1 (Wada *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2009).

Os miRNAs desempenham um papel crucial na regulação e desenvolvimento muscular (McCarthy e Esser, 2007, Callis *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2014). Além disso, muitos estudos têm sido realizados, a fim de compreender o seu papel em doenças músculo-esqueléticas, envelhecimento e em resposta ao exercício (Eisenberg *et al.*, 2007; Drummond *et al.*, 2008; Hamrick *et al.*, 2010; Perbellini *et al.*, 2011; Davidsen *et al.*, 2011). No entanto, poucos estudos foram realizados sobre o comportamento e desempenho dos miRNAs durante a regeneração muscular (Nakasa *et al.*, 2010; Yuasa *et al.*, 2008).

A hipótese desse trabalho é que a atrofia e a recuperação muscular são regulados pela expressão diferencial dos Fatores Reguladores Miogênicos, dos fatores anabólicos e catabólicos e dos miRNAs e que os exercícios aeróbico e resistido podem acelerar esse processo em músculos com características fenotípicas distintas, oxidativas e glicolíticas.

JUSTIFICATIVA

A compreensão dos eventos celulares e moleculares mediadores do processo de hipertrofia muscular podem fornecer subsídios para o desenvolvimento de fármacos terapêuticos eficazes para atenuar a perda progressiva da massa e força muscular decorrente de processos fisiológicos (envelhecimento) e patológicos (câncer, doenças neuromusculares e insuficiência respiratória). Caracterizar o perfil de expressão de fatores miogênicos, fatores catabólicos e anabólicos e dos miRNAs em resposta a recuperação do músculo esquelético contribuirá para prever as respostas

individuais de adaptação ao exercício/treinamento físico, possibilitando uma maior eficácia na prescrição de treinamentos. Tal fato pode contribuir para um melhor direcionamento dos programas de exercício físico tanto no âmbito esportivo como na promoção da saúde.

OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do trabalho foi avaliar as adaptações morfológicas e moleculares dos músculos sóleo e plantar, na atrofia e o efeito dos exercícios aeróbicos e resistido na recuperação muscular após atrofia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar os músculos sóleo (oxidativo) e plantar (glicolítico) submetidos a estímulo atrofico e a influência do exercício (aeróbico e resistido) na recuperação muscular após atrofia.

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

1. Morfológicos e Fenotípicos : AST e porcentagem dos tipos de fibra
2. Expressão de genes:
 - a. MRFs: MyoD e Miogeina;
 - b. Fatores anabólicos : IGF-1
 - c. Fatores catabólicos: MAFbx, MuRF1, Miostatina, FOXO1, FOXO3, PGC-1 α e 4EBP1
3. Expressão de miRNAs miR-23a, miR-128 e myomiRs (miR-1, miR-133a, miR-206)

METODOLOGIA

Animais e Protocolo Experimental

Esse estudo foi realizado no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências (IB), UNESP. Foram utilizados 80 ratos *Wistar* machos (80 dias, 250 a 300 g), provenientes do Biotério Central – UNESP, Botucatu. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia, em ambiente com temperatura controlada (22-24 °C) e ciclo de

luminosidade claro/escuro invertido (12/12 h). Os animais foram providos com ração e água *ad libitum*. Este experimento foi submetido ao Comitê de Ética Animal do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu (Protocolo nº 311). Os animais foram aleatoriamente divididos em 10 grupos experimentais, com 8 animais em cada grupo:

- C: animais controle (submetido a 7 dias de experimento, sem estímulo atrofico).
- I: animais imobilizados (submetido a 7 dias de estímulo atrofico)
- C3: animais controle 3 dias (submetido a 10 dias de experimento, sem estímulo atrofico e não submetido a exercício).
- R3: animais imobilizados e recuperados por 3 dias (submetido a 7 dias de estímulo atrofico e 3 dias de recuperação espontânea, sem exercício físico)
- T3: animais imobilizados e submetidos a exercício aeróbico por 3 dias (submetido a 7 dias de estímulo atrofico e recuperação de 3 dias com exercício aeróbico)
- TF3: animais imobilizados e submetidos a exercício de força por 3 dias (submetido a 7 dias de estímulo atrofico e recuperação de 3 dias com exercício resistido)
- C7: animais controle 7 dias (submetido a 14 dias de experimento, sem estímulo atrofico e não submetido a exercício)
- R7: animais imobilizados e recuperados por 7 dias (submetido a 7 dias de estímulo atrofico e 7 dias de recuperação espontânea, sem exercício físico)
- T7: animais imobilizados e submetidos a exercício aeróbico por 7 dias (submetido a 7 dias de estímulo atrofico e recuperação de 7 dias com exercício aeróbico)
- TF7: animais imobilizados e submetidos a exercício de força por 7 dias (submetido a 7 dias de estímulo atrofico e recuperação de 7 dias com exercício resistido)

Imobilização dos membros posteriores

Inicialmente, os animais dos grupos I, R3, R7, T3, T7, TF3 e TF7 foram anestesiados com Ketamina (50 mg/kg, i.p) e cloridrato de Xilazina (10 mg/kg, i.p), a fim de garantir a completa

sedação dos animais durante a imobilização. Em seguida, o segmento posterior dos animais foi imobilizado com atadura gessada de secagem rápida. A abrangência da imobilização foi do quadril até o tornozelo, de modo que os músculos Sol e Pl permanecessem em posição neutra (Figura 1). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e permaneceram imobilizados durante 7 dias, para promover significativa perda de massa muscular (Appell, 1986; da Silva *et al.*, 2006). Os animais do grupo C, C3 e C7 foram utilizados como controle e mantidos em gaiolas individuais, sem qualquer estímulo atrofico. A atrofia muscular foi confirmada após uma comparação estatística direta dos valores da área de secção transversal (AST) das fibras musculares dos animais dos grupos I e C, sacrificados imediatamente após este período.



Figura 1 – Imagem representativa da Imobilização dos membros inferiores dos animais dos grupos Imobilizado (I), Recuperado 3 e 7 dias (R3 e R7) e Treinados 3 e 7 dias (T3 e T7).

Após o período de imobilização, os animais do grupo R3 e R7 foram mantidos em gaiolas e não foram submetidos a um programa de recuperação, enquanto os animais dos grupos T3 e T7 foram submetidos a exercício aeróbico, de natação e os animais dos grupos TF3 e TF7 foram submetidos a exercício de salto. Todos os animais do experimento foram adaptados ao treinamento de natação para minimizar os efeitos do estresse proporcionado pelos exercícios. Todos os animais dos grupos C, C3, C7, R3 e R7 foram mantidos em água rasa durante todo o período de treinamento.

Protocolo do treinamento aeróbico

O treinamento aeróbico foi realizado em um aquário subdividido em compartimentos individualizados, contendo água a 28-32°C e 50 cm de profundidade (Figura 2). O volume (tempo) e intensidade (sobrecarga) de treinamento foram determinados por meio do teste de lactato descrito por Manchado *et al.*, (2005) realizado num período anterior ao experimento. A partir desse teste foi determinado o limiar anaeróbico que corresponde a uma intensidade limite entre capacidade aeróbia e anaeróbia. Portanto, os animais foram submetidos a 20 minutos de treinamento com 3 % do peso corporal como sobrecarga. Dessa forma, esse protocolo foi realizado durante todo o treinamento de 3 e 7 dias (T3 e T7). As sessões de treinamento foram realizadas sempre no mesmo período do dia, entre 14 e 16h.

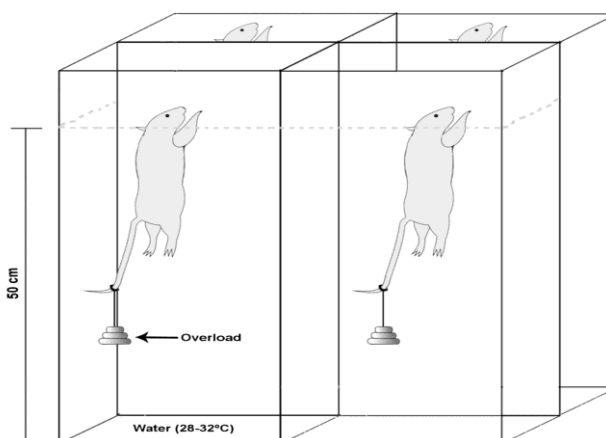


Figura 2 – Imagem representativa do treinamento aeróbico com carga dos animais dos grupos T3 e T7.

Protocolo do treinamento resistido

O treinamento resistido foi realizado em um recipiente contendo água a 28-32°C e 50 cm de profundidade (Figura 3). O treinamento consistiu de três séries de 10 saltos cada, em meio líquido, por 3 e 7 dias (TF3 e TF7) com sobrecarga equivalente a 60% do peso corporal, adaptado de Cunha *et al.* (2005). Foi utilizado um colete acoplado ao tórax dos animais para fixar as anilhas de peso. Os animais foram submetidos ao treinamento de salto, sendo contabilizados apenas os

saltos que os animais retirassem a cabeça da água. As sessões de treinamento foram realizadas sempre no mesmo período do dia, entre 14 e 16h.

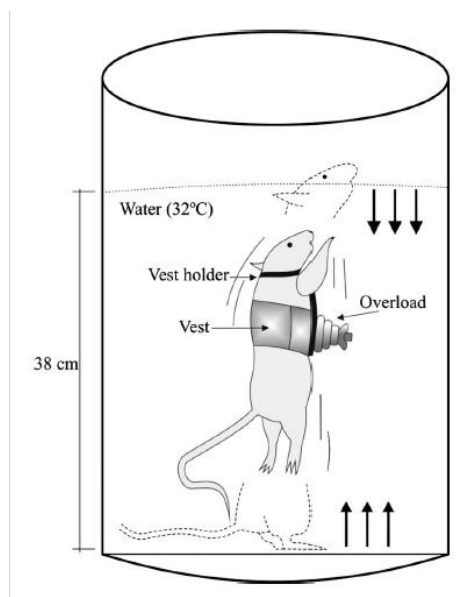


Figura 3 – Imagem representativa do treinamento resistido com carga dos animais dos grupos TF3 e TF7.

Dados Anatômicos

Durante todo o período de experimento foram monitorados, diariamente, o peso corporal e o consumo de ração dos animais. Ao término do experimento os animais foram pesados e sacrificados por decapitação. A seguir, os músculos PL e Sol foram coletados e pesados. A relação entre o peso do músculo (PM) e comprimento da Tíbia (CT) dos animais (PM/CT) foi utilizada como índice de atrofia ou hipertrofia das fibras musculares.

Análise Histoquímica e Área de secção transversal (AST) das fibras musculares

Após a retirada do músculo, uma porção foi imediatamente congelada em n-Hexano resfriado em nitrogênio líquido (-156 °C) e armazenada em freezer a -80 °C. Cortes histológicos (12 µm) foram obtidos em um criostato a -20 °C. Foi realizada a coloração por hematoxilina e eosina (HE) para a análise da morfologia geral e da área de secção transversal (AST) das fibras musculares e a reação histoquímica da mATPase (miofibrillar adenosine triphosphatase) para a análise dos tipos de fibras (Staron *et al.*, 1999).

Utilizando-se um Sistema de Análise de Imagens (Leica Qwin) estão sendo determinadas a frequência dos tipos de fibras e mensurada a AST de aproximadamente 800 fibras (4 campos aleatórios de cada músculo) de cada animal.

Análise Bioquímica da Cadeia Pesada das Miosinas (MyHC)

A análise bioquímica das MyHCs foi realizada por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida duodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Para tanto, foram coletados 12 cortes de 12 µm de espessura de cada amostra previamente congelada para a análise morfológica. Os cortes foram colocados em 0,5 ml de uma solução contendo glicerol 10 % (w/vol), 2-mercaptoetanol 5 % (vol/vol) e *sodium dodecylsulfate* (SDS) 2,3 % (w/vol) em Tris/HCl *buffer* 0,9% (Ph 6,8) (w/vol). Em seguida, os cortes foram agitados durante um minuto e aquecidos por 10 minutos a 60 °C. Está sendo realizada a eletroforese de pequenas quantidades dos extratos (5-8 µl), em gel (gradiente de 7-10 %) de poliacrilamida (SDS), com um gel de empacotamento a 4%, em um período de 26 h de corrida a 185 V e, em seguida, corados com Coomassie Blue (Bärr e Pette, 1988).

Os géis foram utilizados para determinar a presença das isoformas de MyHC identificadas de acordo com seus respectivos pesos moleculares, evidenciando as bandas nas regiões correspondentes.

Avaliação da expressão gênica dos RNAs mensageiros (mRNAs) e dos microRNAs (miRNAs)

A expressão dos mRNAs e dos miRNAs foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR), seguindo as orientações do MIQE: Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment (Bustin, 2009).

a) Extração e análise da qualidade do RNA

Para a amplificação dos miRNAs e dos mRNAs alvo, a extração do RNA foi realizada com TRIzol (*Life Technologies, EUA*), segundo as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com TURBO DNase (*Ambion, EUA*) para remover a contaminação com DNA genômico. A

concentração de RNA, em ng/ μ L, foi determinada por meio do espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000 UV-Vis* (Nanodrop Technologies, EUA). A qualidade do RNA foi obtida pelo número da integridade do RNA (*RNA Integrity Number*, RIN), a partir da análise dos RNAs ribossomais baseadas em microfluidos, utilizando-se o sistema *2100 Bioanalyzer* (Agilent, EUA).

b) Reação de Transcrição Reversa dos mRNAs

A transcrição reversa dos mRNAs obtidos foi realizada utilizando o kit *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Esse kit é responsável pela produção de cDNA de alta qualidade e precisão. Para a reação foram utilizados 4 μ L de *Master Mix* para a transcrição reversa ao qual foi adicionado 2 μ g de RNA e o volume completado para 20 μ L com água livre de nucleases. A mistura foi incubada nas seguintes condições: 25 °C por 5 min, 42 °C por 30 min seguidos da inativação da transcriptase reversa a 85 °C por 5 min.

c) Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real - RT-qPCR (mRNA)

Os níveis de expressão dos genes alvos foram detectados a partir de uma reação 2 μ L de cDNA, correspondendo a 20 ng do RNA total, por RT-qPCR através do QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR Systems (Life Technologies, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. As condições de ciclagem foram de 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. A amplificação das amostras foi realizada com Power SYBR Green PCR master mix (Life Technologies, USA), em duplicata e volume final de reação de 25 μ L. As sequências dos primers utilizados foram desenhadas no software Primer Express 3.0.1 (Life Technologies, USA) e estão listados na Tabela 1.

A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método do Cq comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (Livak e Schmittgen, 2001) pelo software Data Assist 2.0 (Life Technologies). Três genes de referência (PpIa, PpIb e HPRT) foram analisados pelo software geNorm (version 3.5, written by

Vandesompele *et al.* 2002) e os genes mais estáveis foram utilizados como genes de referência. O fator de normalização gerado pelo software foi utilizado para normalizar os dados de expressão dos genes alvo.

Tabela 1. Primers utilizados para RT-qPCR

Gene	Número de Acesso		Sequencia (5' – 3')
MyoD	NM_176079.1	R	GAAGGCAGGGCTTAAGTGTG
		F	TTTTTCATGCGACTCACAGC
Miogenina	NM_017115.2	R	ATAGAAGTGGGGCTCCTGGT
		F	GTCTTTTCCGACCTGATG
MAFbx	NM_133521	R	GGATCTGCCGCTCTGAGAAGT
		F	GACCTGCATGTGCTCAGTGAAG
MuRF1	NM_080903	R	GTGAAGTTGCCCCCTTACAA
		F	TGGAGATGCAATTGCTCAGT
FOXO1	NM_001191846.2	R	CTCGCTCTCTTCTAGCAGGC
		F	CAGTCCAACTCGACCACCTC
FOXO3	NM_001106395.1	R	TCCACATTCCCTCCTCCTCCCT
		F	CCCTGCGAGTGTCTATAACTTTG
PGC-1α	NM_176075.2	R	CCGTCAGGCATGGAGGAA
		F	CATTGATGCACTGACAGATGGA
Miostatina	NM_019151.1	R	CGACAGCACCGCGATTC
		F	GGTCCCGGAGAGACTTTGGG
4E-BP1	NM_053857.2	R	TCCAGAGGTTGGGGCTAGAA
		F	ACTCTCACCTACACCCTCCC
IGF-1	NM_052807.2	R	ATCTGCAATCTCTCCAGCCA
		F	CTAAGGCCAGAGGTGGAGAATAA
PpIa	NM_017101.1	R	TGCCTTCTTTACCTTCCCAA
		F	TGGCAAATGCTGGACCAAAC
PpIb	NM_022536.1	R	AGCAAAAGGAAGACGACGG
		F	TCTCGGAGCGCAATATGAAGG
HPRT	NM_012583	R	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGC
		F	CTCATGGACTGATTATGGACAGGA

MAFbx: *Muscle Atrophy F-box*; MuRF1: *Muscle RING Finger 1*; FOXO1: *Forkhead Box Protein O1*; FOXO3: *Forkhead Box Protein O3*; PGC-1 α : *Peroxisome Proliferative Activated Receptor- γ Coactivator 1 α* ; 4E-BP1: Fator Iniciador Eucarioto 4E Proteína Ligase 1; IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina 1; PpIa: *Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)*; PpIb: *Peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)*; HPRT: *Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase*

d) Reação de Transcrição Reversa dos miRNAs

A transcrição reversa dos miRNAs foi realizada utilizando o kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Life Technologies, EUA) combinado com o kit *TaqMan[®] MicroRNA Assays* (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Esse sistema permite a transcrição reversa apenas de miRNAs maduros e não é afetado pela contaminação com DNA genômico. Para a reação foram utilizados 5 µL (1 a 10 ng) de RNA total, 3 µL de 5X RT *primers* (incluindo *primers* senso, anti senso e sonda *TaqMan[®]*), 0,15 µL dNTPs com dTTP (100 mM), 1 µL *MultiScribe[™] Reverse Transcriptase* (50 U/µL), 1,5 µL de 10X RT *Buffer*, 0,19 µL *RNase Inhibitor* (20 U/µL), e o volume completado para 15 µL com água livre de nucleases. A mistura foi incubada nas seguintes condições: 40 ciclos de 16 °C por 2 min, 42 °C por 1 min e 50 °C por 1 s seguido da inativação da transcriptase reversa a 85 °C por 5 min.

e) PCR quantitativo em Tempo Real (miRNA)

As amostras de cDNA (miRNAs) foram analisadas com ensaios *TaqMan* (Life Technologies, EUA), contendo *primers* e sondas de hidrólise específicos para os miRNAs miR-1, -23a, 128, -133a, -206 (Tabela 2). Para cada reação foram utilizados 1 µL de ensaio *TaqMan[®]*, 10 µL de *TaqMan[®] Universal PCR Master Mix*, No *AmpErase[®] UNG* (2X) (Life Technologies, EUA), 1,33 µL de cDNA e o volume final ajustado para 20 µL com água livre de nucleases. As reações foram realizadas por meio do *QuantStudio[™] Real-Time PCR Systems* (Life Technologies, EUA) e utilizadas as seguintes condições de ciclagem: 95 °C por 10 min., seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min.

A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método do Cq comparativo (Livak e Schmittgen, 2001) e o miR-U6 foi utilizado como normalizador, pois teve expressão constante entre todas as amostra.

Tabela 2. Ensaios TaqMan® utilizados para amplificação por RT-qPCR.

miRBase ID	Numero de acesso miRBase	Sequencia do miRNA
rno-miR-1	MIMAT0003125	UGGAAUGUAAAGAAGUGUGUAU
rno-miR-23a	MIMAT0000078	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC
rno-miR-128	MIMAT0000424	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU
rno-miR-133a	MIMAT0000839	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG
rno-miR-206	MIMAT0000879	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG

Análise Estatística

Para a análise estatística dos valores da expressão gênica e dos dados anatômicos e morfométricos, foram utilizadas a análise de variância (ANOVA) para o modelo com 2 fatores (Zar, 1999) quando comparados os grupos de 3 e 7 dias seguido por teste post-hoc de Tukey e o teste t para comparação entre o grupo C e I. A frequência dos tipos de fibras foi analisada por meio do teste de Goodman para contrastes entre e dentro de populações multinomiais (Goodman, 1964, 1965). O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

Peso corporal (PC), consumo alimentar e peso dos músculos sóleo e plantar

Ao longo do experimento, o peso corporal e o consumo de ração de todos os grupos foram aferidos, a fim de estabelecer um padrão no consumo alimentar e homogeneidade dos animais. Não foram observadas diferenças significativas no peso corporal inicial (PI) e final (PF), assim como no consumo de ração entre os grupos estudados.

Para avaliação da atrofia muscular foi utilizado o método indireto da relação entre peso dos músculos Sol e Pl pelo comprimento da Tíbia (Sol/Tb e Pl/Tb) e verificou-se diminuição

significativa no grupo Imobilizado (I), quando comparado com o grupo Controle (C) tanto para o músculo Sol como para o Pl (Figuras 4).

Os grupos submetidos a 3 dias de recuperação, após atrofia, apresentaram uma diminuição significativa da relação Sol/Tb e Pl/Tb dos animais dos grupos Recuperado (R3), Treinado Aeróbico (T3) e Treinado Força (TF3) quando comparados ao grupo controle (C3) (Figuras 4). Nos grupos submetidos a 7 dias de recuperação, a relação Sol/Tb dos grupos Recuperado (R7) e Treinado Força (TF7) apresentaram uma diminuição significativa em relação ao grupo Controle (C7), enquanto que o grupo Treinado (T7) não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo Controle (C7) (Figura 4). A relação Pl/Tb apresentou diminuição significativa em todos os grupos estudados (R3, T3, TF3, R7, T7 e TF7) quando comparados ao grupo Controle (C3 e C7) (Figura 4).

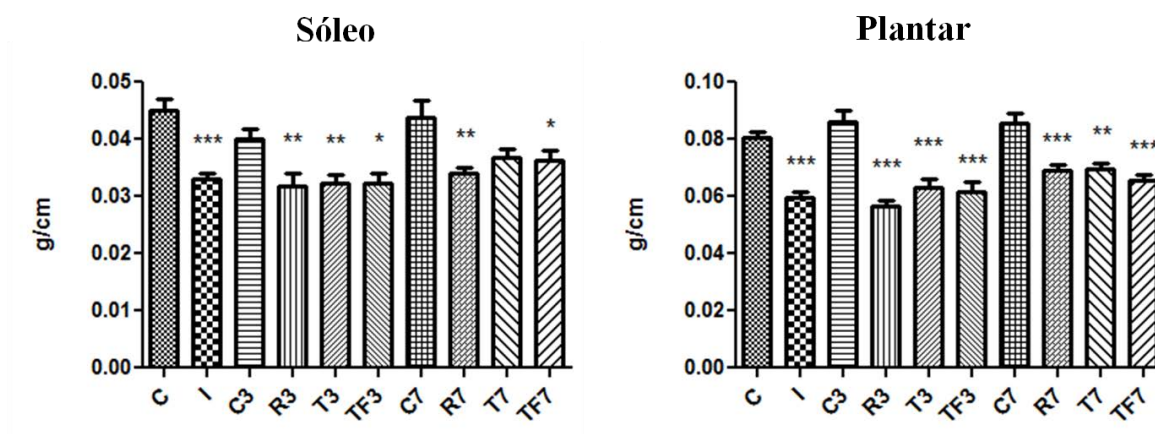


Figura 4. Relação peso dos músculos sóleo e plantar pelo comprimento da tíbia (Sol/Tb e Pl/Tb) entre os grupos Controle (C) X Imobilizado (I); Controle 3 dias (C3) X Recuperado 3 dias (R3) X Treinado 3 dias (T3) X Treinado Força 3 dias (TF3); Controle 7 dias (C7) X Recuperado 7 dias (R7) X Treinado 7 dias (T7) X Treinado Força 7 dias (TF7);. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Análise morfológica

A análise dos cortes histológicos das amostras dos músculos Sol e Pl, de todos os grupos, mostrou fibras musculares de formato arredondado ou poligonal e núcleos periféricos, separadas

por finos septos de tecido conjuntivo frouxo, o endomísio, e septos mais espessos de tecido conjuntivo denso, o perimísio, separando as fibras musculares em fascículos (Figura 5 e 6).

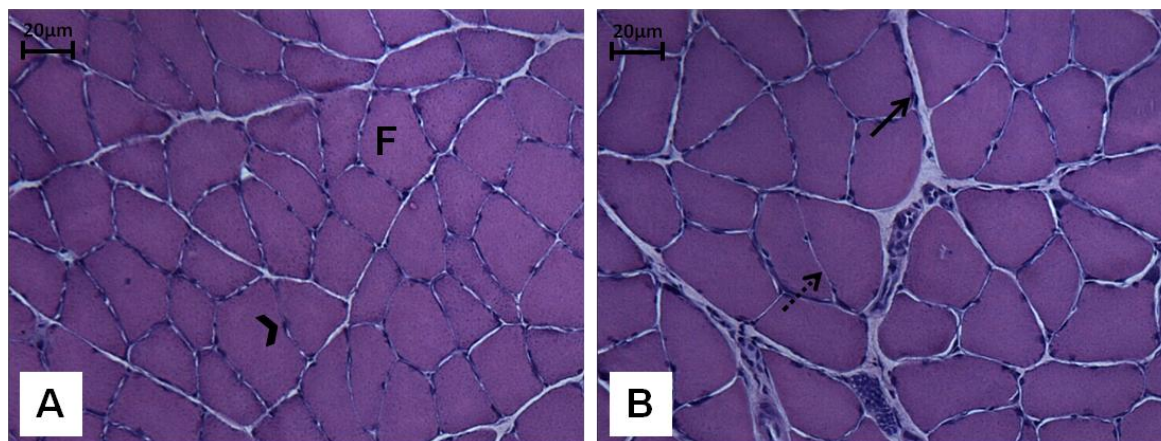


Figura 5. Corte transversal do músculo sóleo. Imagens representativas dos grupos Imobilizado (A) e Controle (B) em Coloração HE. Fibra muscular (F), perimísio (seta contínua), endomísio (seta descontínua) e mionúcleo (ponta da seta). Barra 20µm.

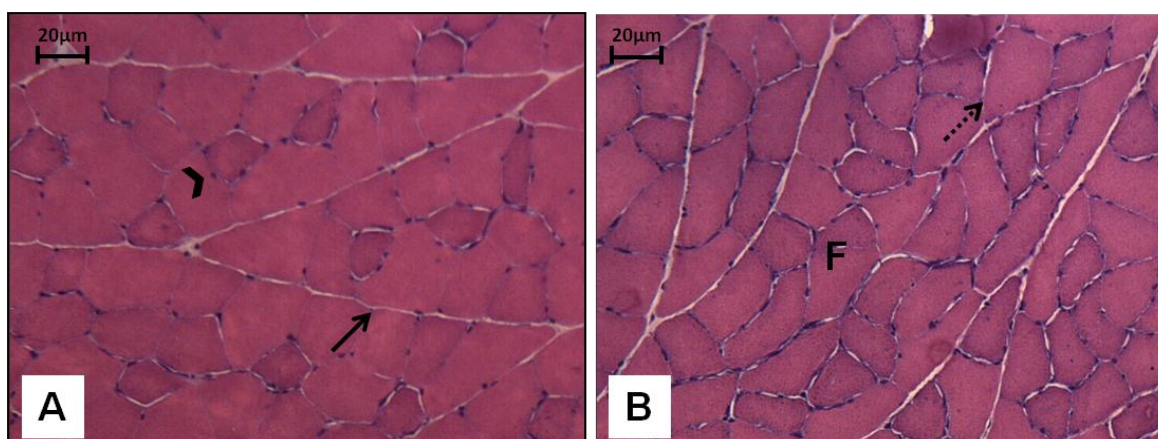


Figura 6. Corte transversal do músculo plantar. Imagens representativas dos grupos Imobilizado (A) e Controle (B) em Coloração HE. Fibra muscular (F), perimísio (seta contínua), endomísio (seta descontínua) e mionúcleo (ponta da seta). Barra 20µm.

Análise histoquímica das fibras musculares

Para a caracterização dos tipos e subtipos das fibras musculares foi realizada a análise histoquímica da ATPase miofibrilar (mATPase) nos cortes histológicos dos músculos Sol e Pl. Foram utilizados os pHs 4,1, 4,5, e 10,6 para o músculo Pl, e o pH 4,1 para o músculo Sol durante a pré-incubação. Deste modo, foi possível identificar a presença das fibras puras I, IIA, IID e IIB e

híbridas IC/IIC no músculo Pl (Figura 7) e das fibras puras I e IIA e híbridas IC/IIC no músculo Sol (Figura 7), de acordo com a intensidade de coloração (Staron *et al.*, 1999).

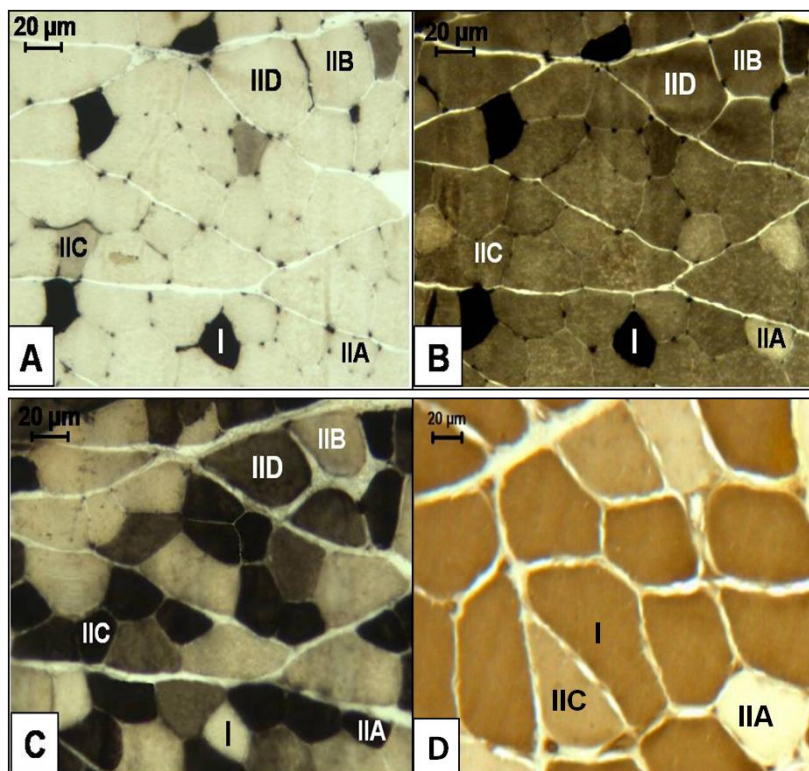


Figura 7. Cortes transversais seriados dos músculos plantar (A, B e C) e sóleo (D) de um animal representativo do grupo controle. Análise histoquímica da ATPase miofibrilar (mATPase) em pH 4,1 (A), 4,5 (B), 10,6 (C) e 4,1 (D). Fibras musculares tipo I, IC/IIC, IIA IID e IIB.

Após a padronização dos pHs para a técnica de ATPase, todas as amostras de ambos os músculos estudados foram coradas, e captadas imagens de 4 campos aleatórios dessas amostras. Na sequência, foi determinada a frequência dos tipos de fibras nessas imagens. Não foi observada diferença significativa na porcentagem relativa da frequência das fibras do tipo I e IIA do músculo Sol, no entanto houve um aumento significativo nas fibras do tipo IC/IIC nos animais do grupo I comparados ao grupo C. O músculo Pl não apresentou alteração na frequência dos tipos de fibras após a imobilização (Figura 8).

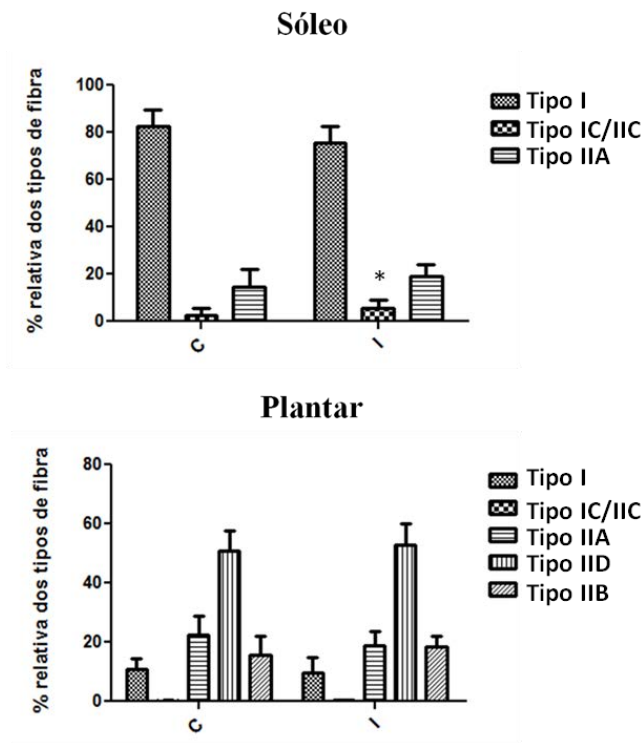


Figura 8: Porcentagem relativa da frequência dos tipos de fibra do músculo sóleo e plantar nos grupos C: Controle e I: Imobilizado. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$.

Após 7 dias de recuperação não foi encontrada diferença significativa entre os tipos de fibra nos músculos Sol e Pl em nenhum dos grupos estudados quando comparados ao grupo controle (Figura 9).

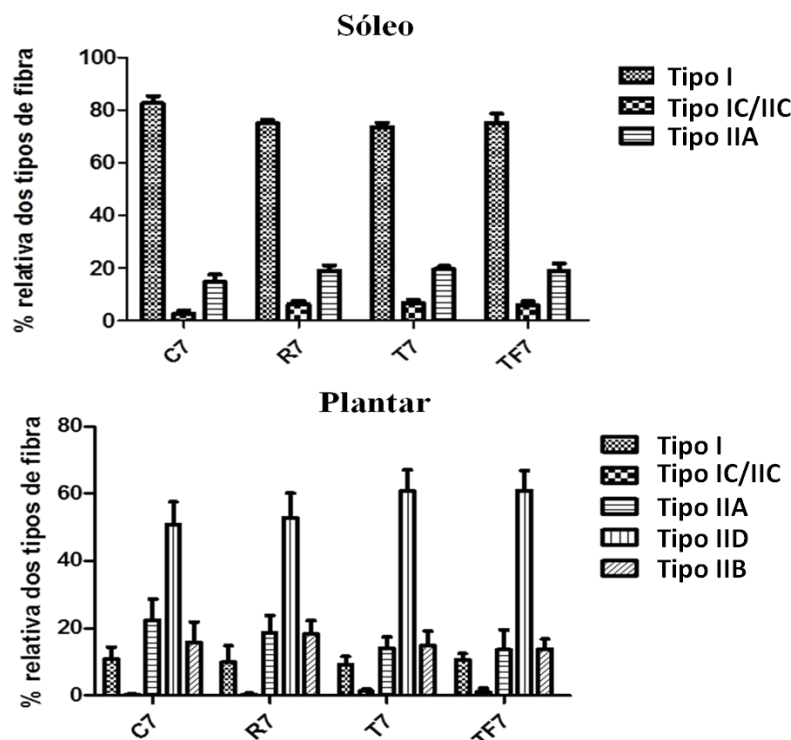


Figura 9: Porcentagem relativa da frequência dos tipos de fibras dos músculos sóleo e plantar nos grupos C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias, T7: Treinado 7 dias e TF7: Treinado Força 7 dias. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$.

Além da análise da frequência relativa dos tipos de fibra também foi avaliada a AST dos tipos específicos de fibra musculares, pela técnica histoquímica da ATPase miofibrilar, nos músculos Sol e Pl. Observou-se que em ambos os músculos todos os tipos de fibra atrofiaram significativamente, quando comparados os grupos C e I (Figura 10). No entanto, a porcentagem de atrofia nas fibras do músculo Sol (predominantemente oxidativo), foi menor do que a das fibras do músculo Pl (predominantemente glicolítico): músculo Sol: Tipo I (-13%), Tipo IC/IIC (-20%) e Tipo IIA (-21%); músculo Pl: Tipo I (-55%), Tipo IC/IIC (-33%), Tipo IIA (-60%), Tipo IID (-62%) e Tipo IIB (-67%) (Figura 10).

Após 3 dias de recuperação, nenhum dos grupos estudados apresentou recuperação da AST de nenhum dos tipos de fibra identificados.

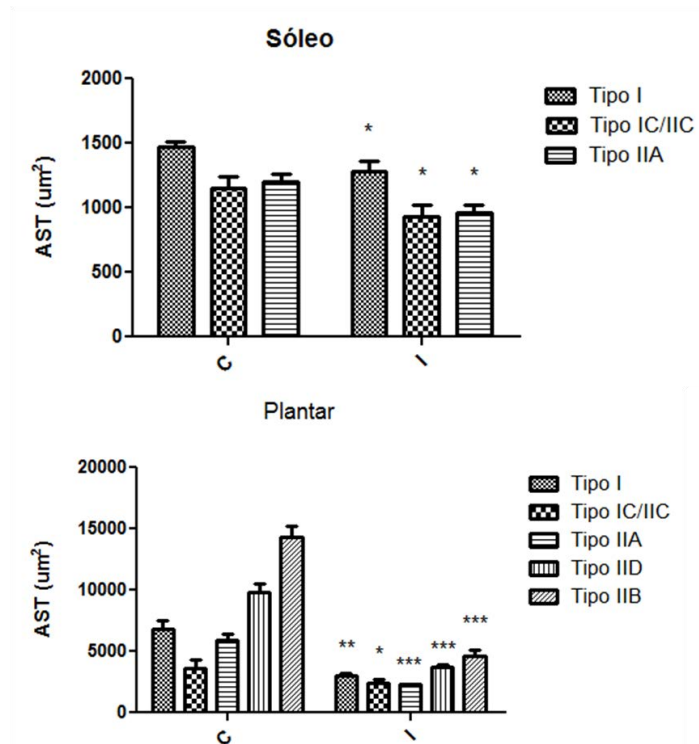


Figura 10: Área de secção transversal (AST) dos tipos de fibra nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle e I: Imobilizado. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Após 7 dias de recuperação, observou-se que o músculo Sol no grupo T7 não apresentou diferença estatisticamente significativa em nenhum dos tipos de fibra, enquanto os grupos R7 e TF7 apresentam diminuição na AST em todos os tipos de fibras estudados comparados ao grupo C7. No músculo Pl as fibras do Tipo IC/IIC de todos os grupos estudados, assim como as fibras Tipo I do grupo TF7, não apresentaram diferença estatisticamente significativa na AST quando comparados ao grupo C7. No entanto, as fibras do Tipo IIA, IID e IIB apresentaram diferença estatisticamente significativa em todos os grupos estudados comparados ao C7 (Figura 11).

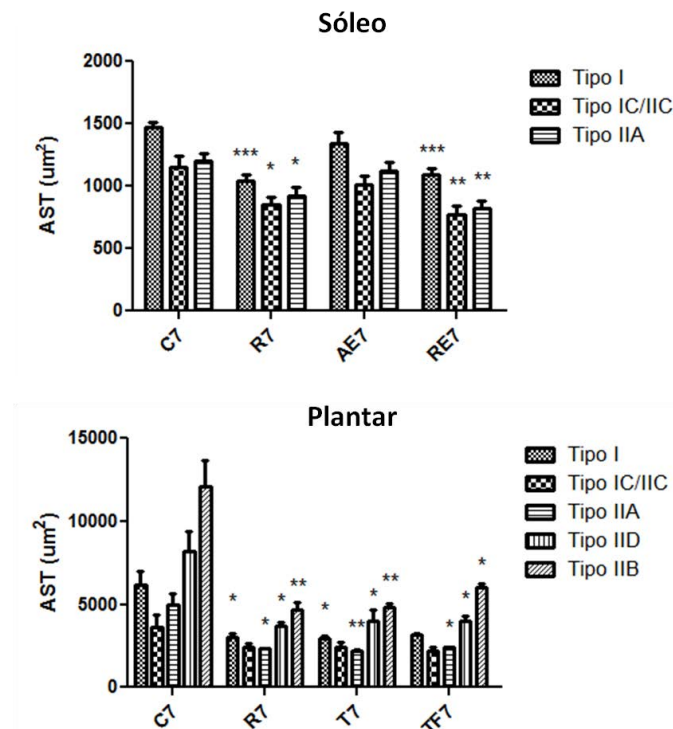


Figura 11: Área de secção transversal (AST) dos tipos de fibra nos músculos sóleo e plantar dos grupos C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Análise Bioquímica da Cadeia Pesada das Miosinas (MyHC)

Os géis corados com Coomassie Blue foram utilizados para determinar a presença das isoformas de MyHC identificadas de acordo com seus respectivos pesos moleculares. No músculo Sol foram evidenciadas as MyHCs I e IIA e no músculo Pl as MyHCs I, IIA, IID e IIB (Figura 12).

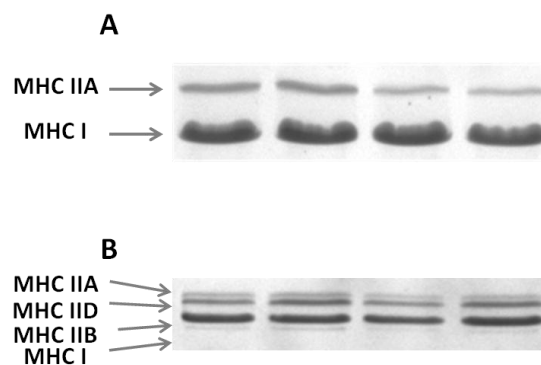


Figura 12. Imagem representativa da separação eletroforética (SDS-PAGE) das isoformas de MyHC do músculo sóleo (A) e plantar (B) no Grupo C.

A percentagem relativa das isoformas de miosina não sofreu alteração significativa em nenhum dos grupos de ambos os músculos estudados.

Avaliação quantitativa da expressão gênica dos mRNAs por qRT-PCR

A eletroforese em gel de agarose (1%) realizada com amostras contendo o RNA total dos músculos Sol e Pl forneceram uma estimativa da integridade do RNA extraído, constatada pela presença das bandas dos RNAs ribossomais 28S e 18S.

Foram realizadas análises da expressão gênica dos músculos Sol e Pl por meio da RT-qPCR. Os resultados referentes à expressão desses genes alvos foram normalizados com genes constitutivos (PpIa, PpIb e HPRT). O software GENORM foi utilizado para estabelecer os genes mais estáveis para normalização, como descrito por Vandesompele *et al.* (2002).

Os níveis de mRNA do gene MAFbx aumentaram significativamente no grupo I comparado ao C nos músculos Sol e Pl. Os demais grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa para o músculo Pl, porém, no músculo Sol os grupos R3 e TF3 apresentam níveis significativamente mais baixos comparados ao grupo C3. Entre os grupos C7, R7, T7 e TF7 não houve diferença significativa nesses níveis (Figura 13).

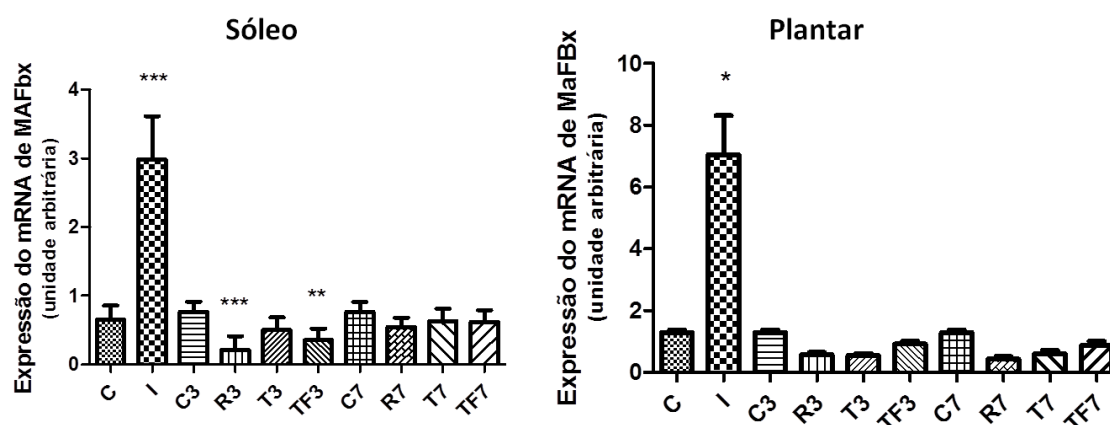


Figura 13. Níveis da expressão do mRNA do MAFbx expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Não houve alteração estatisticamente significativa nos níveis de expressão gênica de MuRF1 em nenhum dos grupos estudados do músculo Sol, porém, no músculo Pl observa-se um aumento significativo ($p < 0,05$) no grupo I quando comparado ao grupo C (Figura 14).

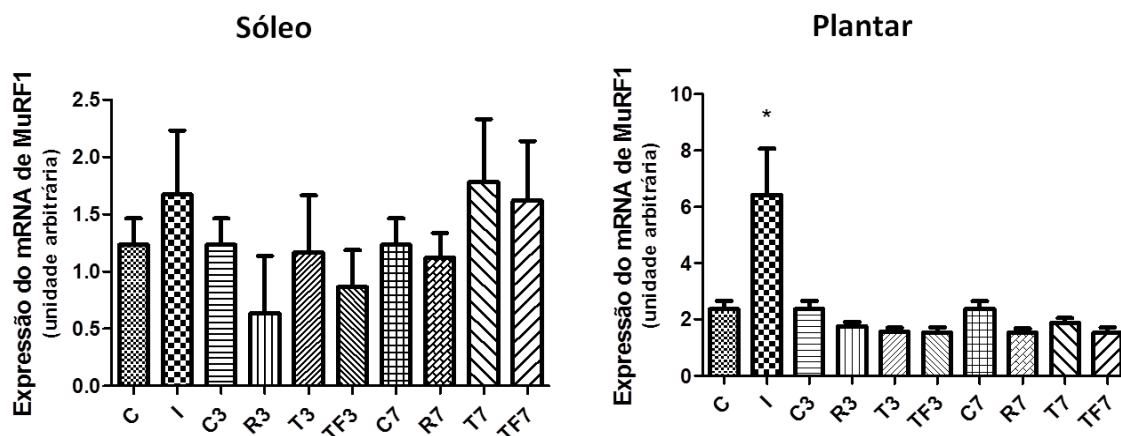


Figura 14. Níveis da expressão do mRNA do MuRF1 expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$.

Os níveis de expressão do mRNA da Miostatina diminuíram no grupo I em ambos os músculos estudados comparados ao C. Após 3 e 7 dias de recuperação não observa-se alterações significativas na expressão desse gene tanto no músculo Sol como no Pl (Figura 15).

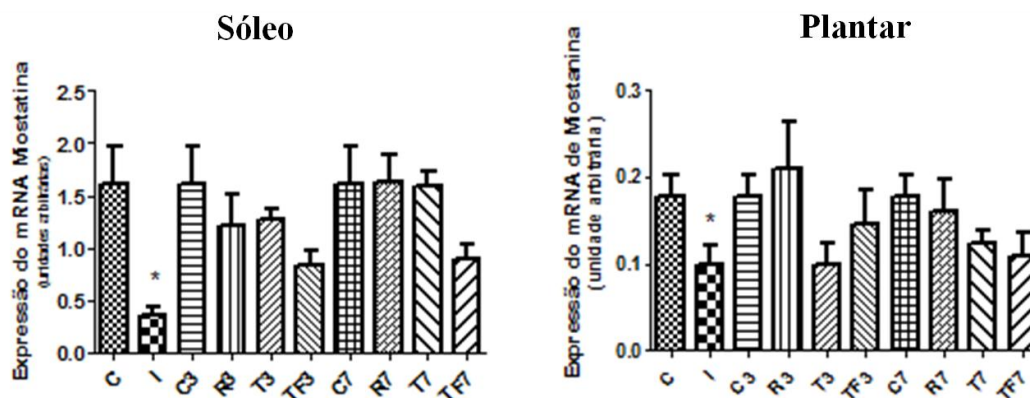


Figura 15. Níveis da expressão do mRNA da Miostatina expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$.

O mRNA do FOXO3 apresentou diminuição significativa nos níveis de expressão gênica do grupo I comparado ao C no músculo Sol, e após 3 dias de recuperação o grupo TF3 apresenta diminuição desses níveis comparado ao C3. Os demais grupos estudados no músculo Sol não

sofreram alterações significativas, assim como todos os grupos estudados no músculo Pl (Figura 16).

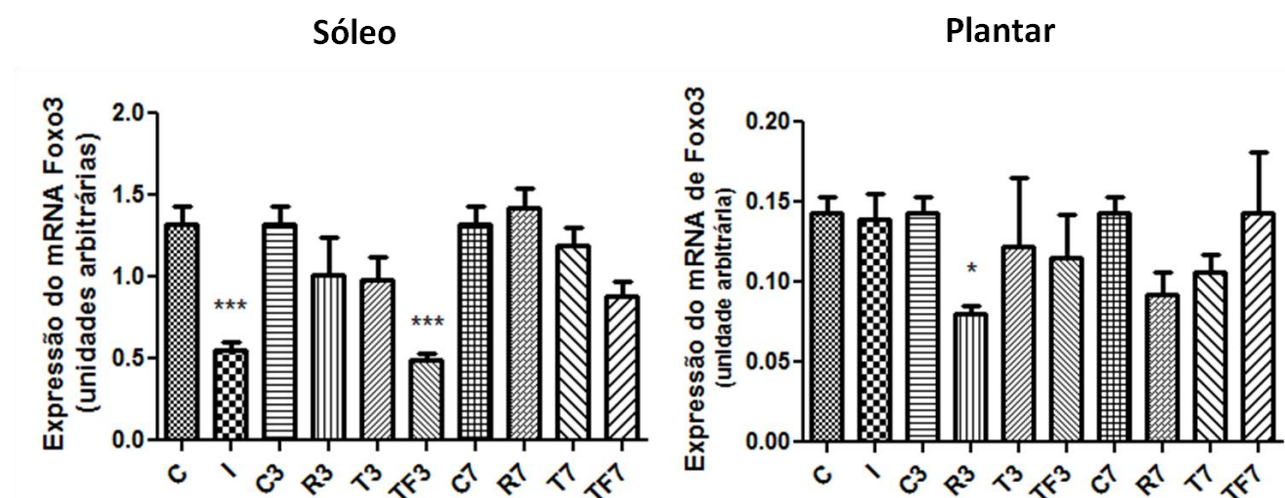


Figura 16. Níveis da expressão do mRNA do FOXO3 expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Os níveis de expressão gênica de FOXO1 não alteraram após sete dias de imobilização nos músculos Sol e Pl comparados ao grupo C, porém após 3 dias de recuperação houve uma diminuição nos níveis de expressão desse gene no grupo TF3 no músculo Sol e T3 no músculos Pl comparado com o C. Após 7 dias de recuperação muscular não apresentam alteração significativa nos níveis de FOXO1 em nenhum dos grupos estudados em ambos os músculos (Figura 17).

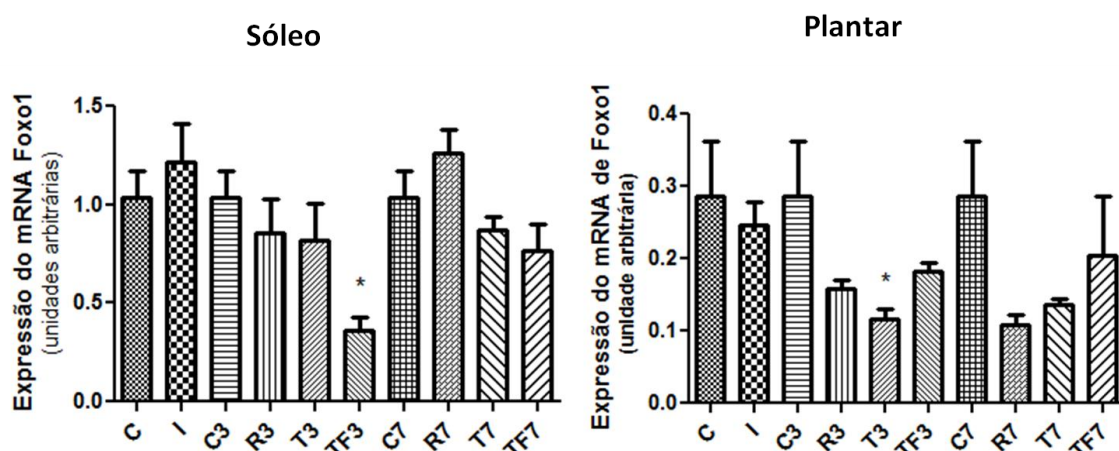


Figura 17. Níveis da expressão do mRNA do FOXO1 expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias,

R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$.

O gene 4E-BP1 apresentou aumento estatisticamente significativo nos níveis de expressão gênica no grupo I quando comparado ao grupo C em ambos os músculos estudados. Após de 3 dias de recuperação esses níveis diminuíram significativamente nos grupos R3 e TF3 do músculo Sol e no grupo R3 do músculo Pl, quando comparados com o grupo C3. Após 7 dias de recuperação, os níveis desse gene não apresentaram alteração significativa em nenhum dos grupos estudados, tanto para o músculo Sol como para o Pl (Figura 18).

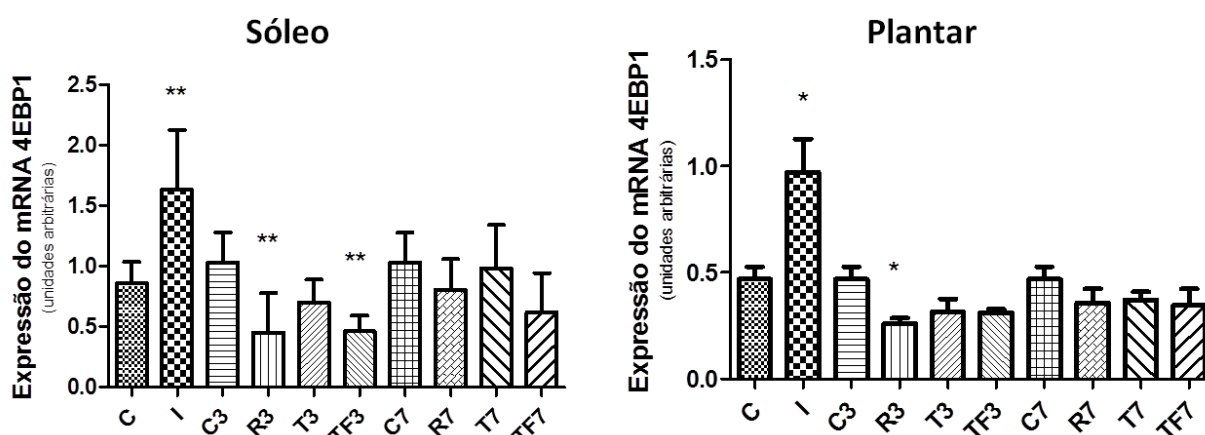


Figura 18. Níveis da expressão do mRNA de 4E-BP1 expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

A expressão gênica de PGC-1 α apresentou uma diminuição significativa de seus níveis no grupo I comparado ao C, em ambos os músculos estudados. Os demais grupos não apresentaram alterações significativas, no músculo Pl após 3 e 7 dias de recuperação muscular. No músculo Sol, após 3 dias de recuperação, o grupo R3 apresenta níveis de expressão gênica reduzidos para PGC-1 α , comparado com o C3. (Figura 19).

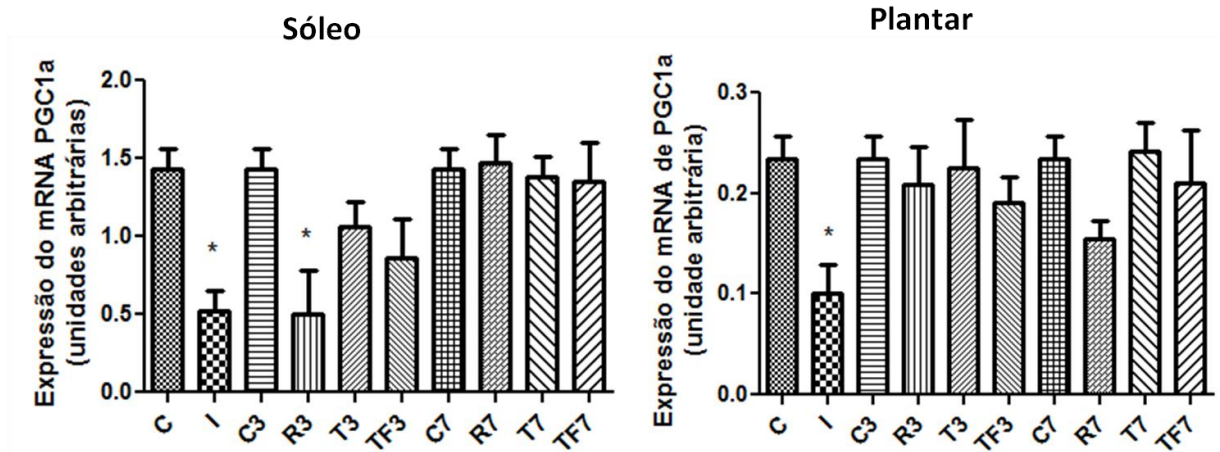


Figura 19. Níveis da expressão do mRNA do PGC1-alfa (PGC-1 α) expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$.

A expressão gênica de MyoD e Miogenina apresentou níveis aumentados significativamente apenas nos grupos T3 e TF3 quando comparados ao grupo C3 no músculo Sol (Figura 20), enquanto que os níveis da expressão gênica da Miogenina estão aumentados nos grupos T3, TF3 e R7 quando comparados com seus respectivos controles (C3 e C7) no músculo Sol (Figura 21). No músculo Pl, nenhum dos grupos estudados sofreu alterações estatisticamente significantes tanto para MyoD quanto para Miogenina (Figuras 20 e 21).

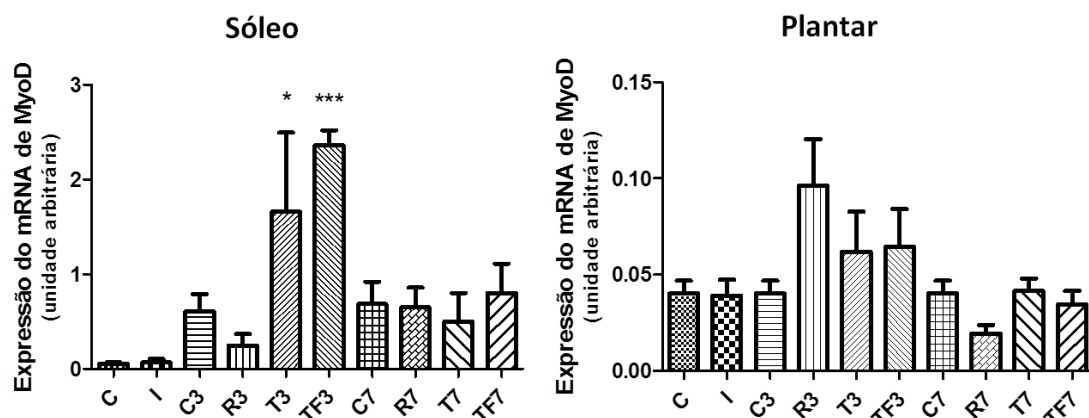


Figura 20. Níveis da expressão do mRNA de MyoD expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

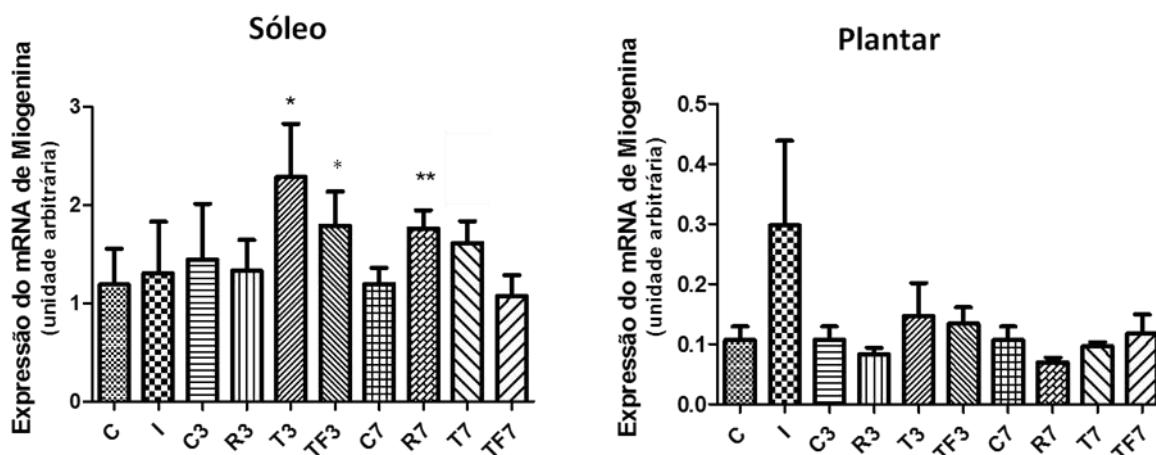


Figura 21. Níveis da expressão do mRNA de Miogenina expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Os níveis de expressão de mRNA do IGF-1 não alteraram no músculo Pl em nenhum dos grupos estudados porém, no Sol, houve um aumento significativo da expressão desse gene no grupo I comparado ao C. Após 3 e 7 dias de recuperação, nenhum grupo apresentou alteração significativa na expressão gênica de IGF-1 (Figura 22).

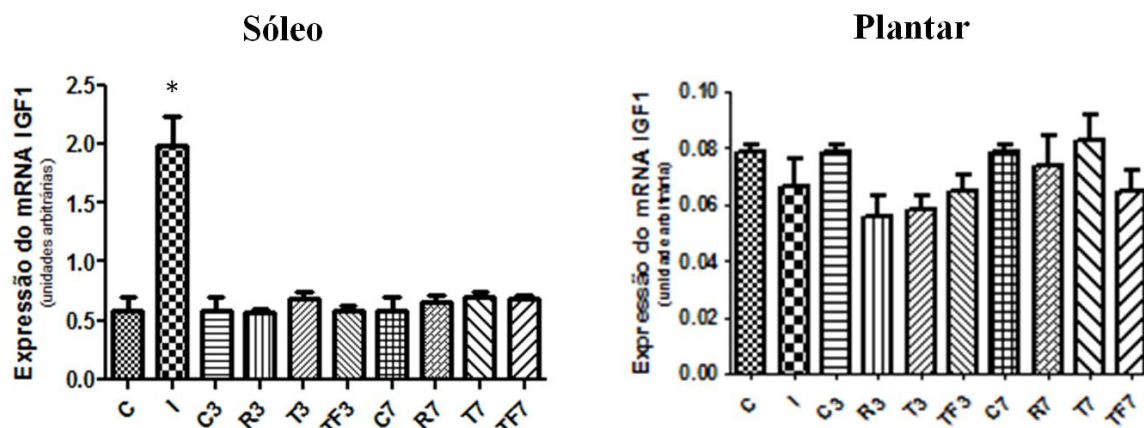


Figura 22. Níveis da expressão do mRNA do IGF-1 expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$.

Avaliação quantitativa da expressão gênica dos miRNAs por qRT-PCR

Os níveis de expressão dos miRNAs miR-1, miR-23a, miR-128, miR-133 e miR-206 foram analisados por qRT-PCR e normalizados pelos níveis de expressão do miR-U6 nos músculos Sol e Pl.

O músculo Sol apresentou uma diminuição nos níveis de expressão de miR-1 após 7 dias de imobilização comparado ao grupo C. Após 3 dias de recuperação muscular, apenas o grupo R3 apresentou diminuição dos níveis de expressão desse miRNA no músculo Sol. Após 7 dias de recuperação, não houve alteração dos níveis de miR-1 entre os grupos estudados no músculo Sol. No músculo Pl não observa-se alteração nos níveis de expressão do miR-1 em nenhum dos grupos estudados (Figura 23).

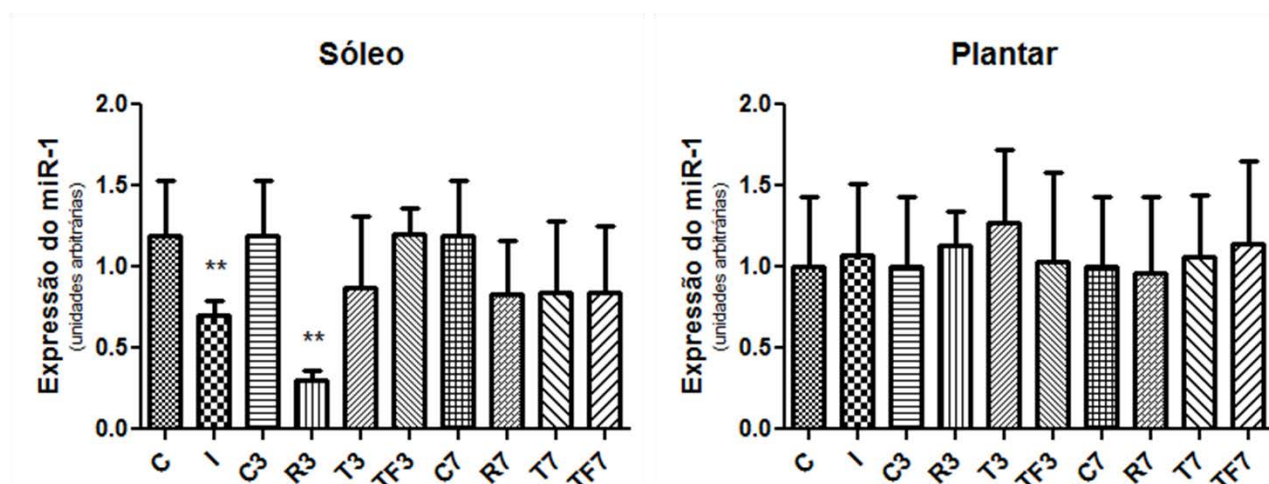


Figura 23. Níveis da expressão do miR-1 expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$.

Os níveis de expressão do miR-23a diminuíram em ambos os músculos estudados após 7 dias de imobilização, comparado com o grupo controle. Após 3 e 7 dias de recuperação muscular esses níveis permaneceram diminuídos nos grupos R3, T3, TF3, R7, T7 e TF7, apenas no músculo Sol. No músculo Pl, nenhum dos grupos apresentou alteração nos níveis de expressão de miR-23a após 3 e 7 dias de recuperação (Figura 24).

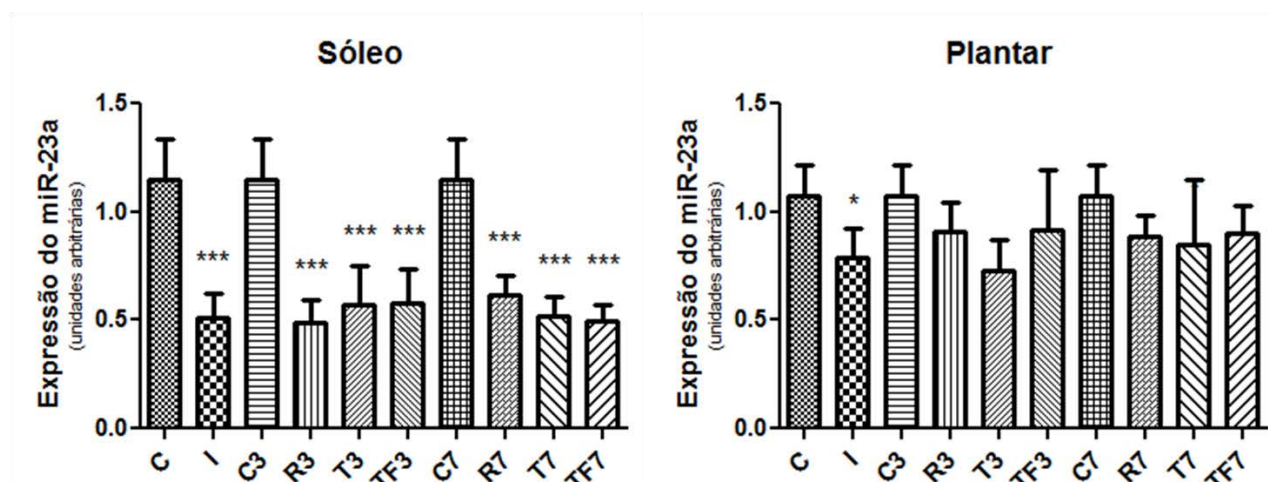


Figura 24. Níveis da expressão do miR-23a expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$.

Após 7 dias de imobilização, os animais do grupo I tiveram os níveis de expressão do miR-128 diminuídos, comparados com o C, em ambos os músculos estudados. Após 3 dias de recuperação, observa-se diminuição desses níveis nos grupos R3, T3 e TF3 e após 7 dias de recuperação, apenas os animais submetidos ao treinamento, aeróbico e resistido, apresentaram os níveis de expressão de miR-128 diminuídos, comparado com o grupo C, no músculo Sol. No músculo Pl, não se observa diferença significativa em nenhum dos grupos estudados, após 3 e 7 dias de recuperação (Figura 25).

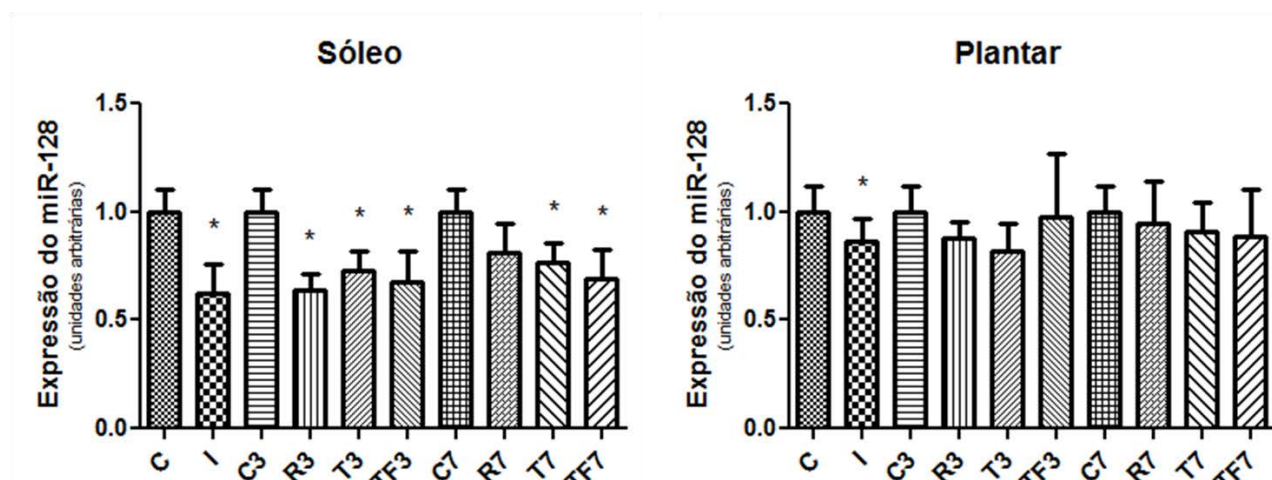


Figura 25. Níveis da expressão do miR-128 expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$.

MiR-133 apresentou diminuição nos níveis de expressão no grupo I, comparado com o C, nos músculos Sol e Pl. No músculo Sol, após 3 e 7 dias de recuperação muscular, os níveis desse miRNA permaneceram diminuídos nos grupos recuperado com e sem exercício (R3, T3, TF3, R7, T7 e TF7). No músculo Pl os níveis de expressão do miR-133 diminuíram nos grupos T3 e TF3 após 3 dias de recuperação e nos grupo R7, T7 e TF7 após 7 dias de recuperação, comparados com o C3 e C7, respectivamente (Figura 26).

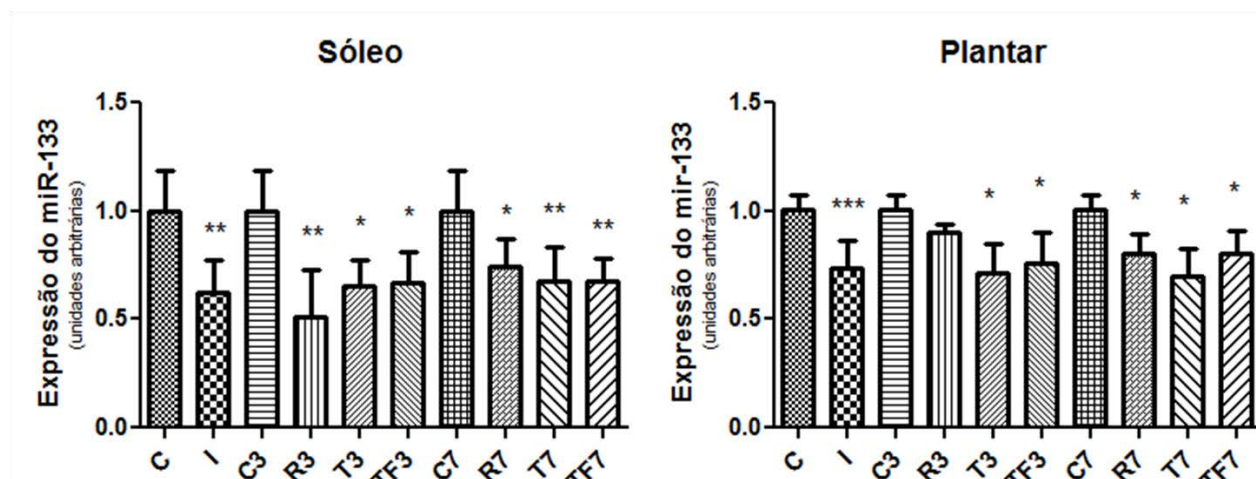


Figura 26. Níveis da expressão do miR-133a expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$.

Os níveis de expressão do miR-206 diminuíram após 7 dias de imobilização no grupo I somente no músculo Sol, comparado com o C. Após 3 dias de recuperação muscular, apenas o grupo R3 apresentou níveis de expressão de miR-206, comparado com o grupo C3. Após 7 dias de recuperação, nenhum dos grupos estudados apresentou alteração nos níveis desse miRNA. No músculo Pl, nenhum dos grupos apresentou mudança significativa nos níveis de miR-206 em nenhum dos momentos estudados, comparado com o controle (Figura 27).

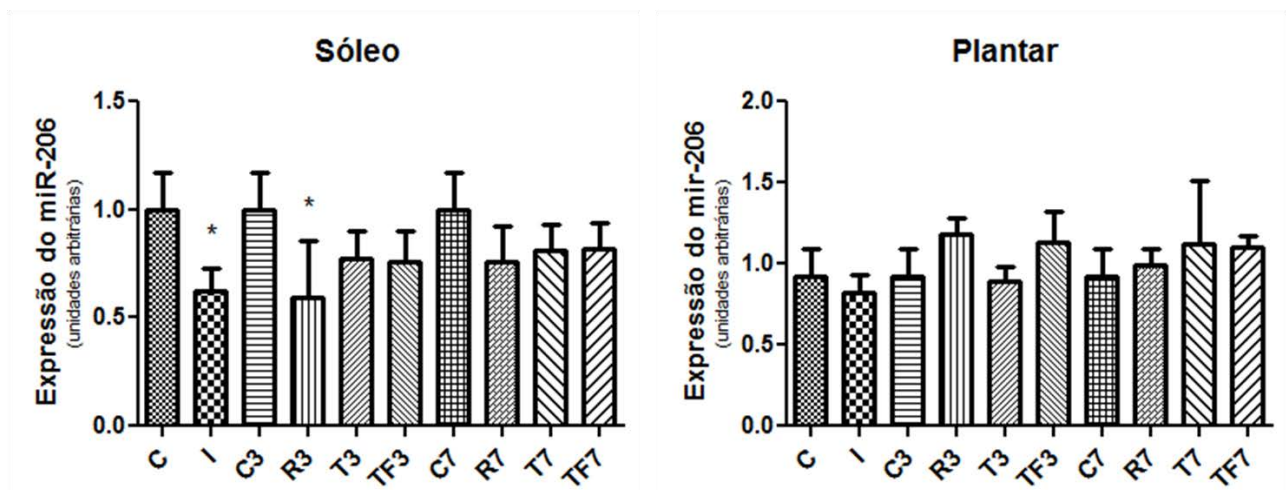


Figura 27. Níveis da expressão do miR-206 expresso em unidades arbitrárias e obtidos por RT-qPCR, nos músculos sóleo e plantar nos grupos C: Controle, I: Imobilizado, C3: Controle 3 dias, R3: Recuperado 3 dias e T3: Treinado 3 dias, TF3: Treinado Força 3 dias, C7: Controle 7 dias, R7: Recuperado 7 dias e T7: Treinado 7 dias, TF7: Treinado Força 7 dias. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$.

A tabela 3 ilustra o resumo dos principais resultados obtidos nesse estudo, em todos os grupos estudados, tanto para o músculo sóleo, quanto para o músculo plantar.

Tabela 3: Resumo dos principais resultados obtidos para o músculo sóleo e plantar.

	Resultados	I	R3	T3	TF3	R7	T7	TF7	I	R3	T3	TF3	R7	T7	TF7
		Sóleo							Plantar						
AST	tipo I	↓	↓	↓	↓	↓	—	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	—
	tipo IIC	↓	↓	↓	↓	↓	—	↓	↓	↓	↓	↓	—	—	—
	tipo IIA	↓	↓	↓	↓	↓	—	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	tipo IID	x	x	x	x	x	x	x	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	tipo IIB	x	x	x	x	x	x	x	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
% relativa	tipo I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	tipo IIC	↑	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	tipo IIA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	tipo IID	x	x	x	x	x	x	x	—	—	—	—	—	—	—
	tipo IIB	x	x	x	x	x	x	x	—	—	—	—	—	—	—
Expressão gênica mRNA	MAFbx	↑	↓	—	↓	—	—	—	↑	—	—	—	—	—	—
	MuRF1	—	—	—	—	—	—	—	↑	—	—	—	—	—	—
	Miostatina	↓	—	—	—	—	—	—	↓	—	—	—	—	—	—
	FOXO3	↓	—	—	↓	—	—	—	—	↓	—	—	—	—	—
	FOXO1	—	—	—	↓	—	—	—	—	—	↓	—	—	—	—
	4E-BP1	↑	↓	—	↓	—	—	—	↑	↓	—	—	—	—	—
	PGC1- α	↓	↓	—	—	—	—	—	↓	—	—	—	—	—	—
	MyoD	—	—	↑	↑	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Miogenina	—	—	↑	↑	↑	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	IGF-1	↑	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Expressão miRNAs	miR-1	↓	↓	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	miR-23a	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	—	—	—	—	—	—
	miR-128	↓	↓	↓	↓	—	↓	↓	↓	—	—	—	—	—	—
	miR-133a	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	—	↓	↓	↓	↓	↓
	miR-206	↓	↓	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

I vs. C; R3, T3 e TF3 vs. C3; R7, T7 e TF7 vs. C7; x ausente, — sem alteração, ↑ aumento e ↓ diminuição.

DISCUSSÃO

Os valores referentes ao peso corporal (PC) são importantes, pois indicam, de modo indireto, as possíveis alterações morfofuncionais dos tecidos corporais. Deste modo, é utilizado como indicador do crescimento somático e das adaptações ao estímulo de treinamento físico (Butkus *et al.*, 1995). No presente estudo os valores referentes ao peso corporal inicial (PI) e do peso corporal final (PF) não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Consistente com estes resultados, o consumo alimentar também não foi diferente entre os grupos.

O período de treinamento aeróbico não promoveu alterações significativas do PC dos animais submetidos aos treinamentos aeróbico (T3 e T7) e resistido (TF3 e TF7) durante todo o experimento, indicando crescimento somático similar entre os grupos estudados. Apesar de alguns estudos demonstrarem que o treinamento aeróbico promove discreta alteração na massa muscular (Moraska *et al.*, 2000; McCarthy *et al.*, 2002), isso não foi observado nesse estudo, possivelmente por conta do curto período de treinamento que os animais foram submetidos.

O peso corporal dos animais também não alterou durante o período de imobilização, porém foi observada diminuição significativa no peso dos músculos (Sol -26,7 %; Pl -26,2 %), na razão peso do músculo pelo comprimento da tíbia (Sol/Tb e Pl/Tb, talvez colocar a razão aqui) e na AST dos tipos de fibras nos dois músculos, após atrofia induzida por imobilização. Semelhante aos nossos achados, uma redução de 27% do peso do músculo Sol em ratos também foi observada após 10 dias de imobilização dos membros posteriores com atadura gessada (Pattison *et al.*, 2003) e Okamoto *et al.* (2011) observaram uma diminuição na massa muscular dos músculos Sol e Pl após 3, 7, 14 e 21 dias de imobilização.

O modelo de atrofia utilizado no nosso estudo promoveu atrofia de todos os tipos de fibras em ambos os músculos, porém a diminuição da AST foi mais acentuada nas fibras do músculo Pl: tipo I (-55 %), tipo IC/IIC (-33 %), tipo IIA (-60 %), tipo IID (-62 %) e tipo IIB (-67 %), enquanto nas fibras do músculo Sol, a porcentagem de diminuição foi de : tipo I (-13 %), tipo IC/IIC (-20 %) e tipo IIA (-21 %). Aoki *et al.* (2006) verificaram que após 7 dias de imobilização a AST das fibras

do Tipo I do músculo Sol diminuiu 27% enquanto a área das fibras do tipo Tipo II do Pl diminuiu 25%, isso em uma análise onde foi observada atrofia apenas no tipo de fibra mais abundante em cada músculo. Em um modelo de atrofia por microgravidade, as fibras do tipo I são primeiramente afetadas nos músculos oxidativos, porém, as fibras do tipo II são primeiramente afetadas em músculos glicolíticos (Martin *et al.*, 1998). Similar ao nosso estudo, outros trabalhos mostraram que fibras de contração rápida (glicolíticas) são mais vulneráveis ao estímulo atrofico do que as fibras de contração lenta (oxidativas). (Suetta *et al.*, 2012; Wang e Pessina 2013; Okamoto *et al.*, 2011).

Em nosso estudo observou-se que após 3 dias de recuperação, todos os grupos estudados apresentaram diminuição na relação peso do músculo pelo comprimento da tíbia, tanto no músculo Sol quanto no Pl, quando comparados com ao grupo C3. No entanto, após 7 dias de recuperação, apenas o músculo Sol apresentou recuperação tanto na relação Sol/Tb como na AST das fibras estudadas no grupo T7 se igualando ao grupo C7. No músculo Pl os grupos estudados apresentaram todos os tipos de fibra com AST diminuída quando comparados ao controle, com exceção das fibras do tipo IIC nos grupos R7, T7 e TF7 e as fibras do tipo I no grupo TF7 que apresentam AST similar ao C7, porém, as fibras Tipo I e IIC são fibras de contração lenta, pouco presentes nesse tipo de músculo, representando juntas, aproximadamente, 15 % do total de fibras musculares encontradas no Pl (Aguar *et al.*, 2013).

Estudos mostram que duas semanas de suspensão dos membros posteriores promoveu atrofia, e que após 7 de recuperação sem intervenção de treinamento as fibras do músculo Sol apresentaram AST menor no grupo atrofiado em relação ao controle, no entanto, após 14 dias de recuperação, a AST do grupo submetido aos estímulo atrofico não apresentou diferença significativa do grupo controle (Oishi *et al.* 2008) e que 14 dias após a retirada do estímulo atrofico os músculos Sol e Pl não apresentam alteração na AST das fibras quando comparados ao controle (Aoki *et al.* 2006).

Dessa forma, pode-se inferir que o treinamento de natação acelerou o processo de recuperação no músculo Sol após atrofia, enquanto o treinamento de força não foi eficiente na

recuperação da AST. No músculo Pl, nenhum dos treinamentos resultou na recuperação da AST, mostrando que tanto o treinamento aeróbico como o resistido não foram suficientes para acelerar o processo de recuperação muscular. Esses achados sugerem ainda, que músculos com características contráteis distintas, não respondem de forma semelhante ao treinamento aeróbico.

Na atrofia muscular ainda estão descritas alterações na expressão das isoformas MyHCs (Bodine e Baehr, 2014). Em nosso estudo, não observamos alterações na distribuição dos tipos de fibra no músculo Pl após o período de imobilização, porém, houve um aumento significativo das fibras IIC no músculo Sol que constituem 8 % das fibras desse músculo (Staron *et al.*, 1999). Esses achados coincidem com os dados da porcentagem relativa das isoformas de miosina que não sofreu alteração significativa em nenhum dos grupos nos músculos Sol e Pl.

Nagatomo *et al.* (2011) observaram uma diminuição na porcentagem de fibras do Tipo I e aumento das do Tipo IIA e IIC no músculo Sol de ratos após período de 3 semanas de suspensão dos membros posteriores enquanto que a distribuição da porcentagem dos tipos de fibra não alterou no músculo Pl. O mesmo foi observado tanto na suspensão dos membros posteriores como na presença de microgravidade (Talmadge *et al.*, 2000). Nos músculos Pl e tibial anterior, compostos principalmente por fibras do Tipo II (IIA, IID e IIB), não foi observada alterações na composição nos tipos de fibras após o estímulo atrofico (Caiozzo *et al.*, 1996). Suspensão do membro traseiro por 7 dias proporcionou uma diminuição na AST de todos os tipos de fibra no músculo Sol, sem alterar a proporção dessas fibras (Cannavino *et al.*, 2014).

Os treinamentos aeróbico (natação) e resistido (salto) utilizados nesse estudo não proporcionaram alteração na porcentagem relativa dos tipos de fibra nos músculos estudados. É provável que o curto período de exposição dos animais tanto ao estímulo atrofico (imobilização) quanto aos tipos de treinamento utilizados não foi suficientes para proporcionar alteração do fenótipo dos músculos Sol e Pl.

A expressão gênica da Miostatina, regulador negativo da massa muscular (Walsh e Celest, 2005; Federeck e Rupert, 2008), mostrou-se diminuída após o estímulo atrofico tanto no músculo

Sol como no Pl. A relação da Miostatina com a atrofia não está totalmente estabelecida. Observa-se aumento dos níveis de Miostatina depois de 5 dias de imobilização em humanos (Dirks *et al.*, 2014), enquanto que após 14 dias de imobilização ocorreu acentuada diminuição na AST das fibras do tipo I e II acompanhada de diminuição dos níveis proteicos de Miostatina no músculo quadríceps de humanos (Snijders *et al.*, 2014). A diminuição da expressão da Miostatina no grupo I sugere que esse gene não atuou na diminuição da massa muscular nesse experimento, fato que provavelmente pode ter ocorrido pela atuação de outros genes clássicos envolvidos com o processo de atrofia, como os atrogenes (MAFbx e MuRF1).

MAFbx e MuRF1 têm sido descritos como marcadores precoces de atrofia por desuso. Níveis de mRNA de MAFbx e MuRF1 são rapidamente aumentados em numerosos modelos de atrofia e parecem contribuir para a iniciação desse processo (Jones *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2009; Abadi *et al.*, 2009; Foletta *et al.* 2011, Okamoto *et al.*, 2011).

Em nosso experimento a expressão de MAFbx e MuRF1 aumentou no grupo imobilizado (I) no músculo Pl, enquanto no músculo Sol, apenas o MAFbx apresentou-se superexpresso comparado com o grupo C. As alterações de MAFbx e MuRF1 encontradas nesse estudo são semelhantes aos achados de Okamoto *et al.* (2011) que estudaram a atrofia dos músculos Sol e Pl em camundongos, e observaram que a imobilização dos membros posteriores promoveu porcentagens de diminuição da massa muscular semelhantes, com aumento na expressão de MAFbx e MuRF1 em ambos os músculos, porém, após 3 e 7 dias de imobilização, o aumento da expressão gênica de MAFbx e MuRF1 foi maior no músculo Pl que no Sol. Assim, nossos resultados corroboram os achados de Okamoto *et al.* (2011) de que as ubiquitina ligases músculo específicas MAFbx e MuRF1 contribuem de forma mais efetiva para a atrofia do músculo Pl do que para a atrofia do músculo Sol, fato que foi confirmado pela diminuição mais proeminente da AST nas fibras glicolíticas, do Tipo IIB (-67%).

Foi demonstrado na literatura que, o miR-23a é potente regulador das ubiquitina ligases músculo-específicas, MAFbx e MuRF1, com papel fundamental na proteção contra a atrofia do

músculo esquelético (Wada *et al.*, 2011). No presente experimento, a atrofia muscular induzida pela imobilização reduziu os níveis de miR-23a em ambos os músculos estudados, juntamente com o aumento da expressão gênica de MAFbx no músculo Sol, e de MAFbx e MuRF1 no músculo Pl. Hudson *et al.*, 2014, mostraram diminuição do miR-23a no músculo Sol de ratos diabéticos, acompanhada de aumento de MAFbx e MuRF1 e atrofia muscular, e 10 dias de repouso reduziu a expressão do miR-23a e diminuição da massa muscular do músculo vasto lateral de humano (Rezen *et al.*, 2014). Wada *et al.*, 2011, observaram que camundongos transgênicos para miR-23a foram mais resistentes a atrofia muscular induzida por Dex. Esses estudos, demonstram que este miRNA está envolvido com o controle da atrofia muscular, regulando as ubiquitina ligases e podem explicar os resultados obtido no nosso experimento.

Após 3 e 7 dias de recuperação muscular com e sem exercício, os níveis de miR-23a permaneceram reduzidos no músculo Sol, enquanto a expressão gênica de MAFbx diminuiu após 3 dias e foi semelhante ao grupo controle após 7 dias de recuperação muscular. No músculo Pl, a expressão de MAFbx e MuRF1 e os níveis de miR-23a foram similares ao grupo C após 3 e 7 dias de recuperação. Estes resultados mostram que o comportamento do miR-23a é distinto nos músculos Sol e Pl na recuperação muscular, e que o exercício aeróbico e resistido não alteraram a expressão de miR-23a durante a recuperação após atrofia. Esse fato sugere que o controle da expressão MAFbx durante a recuperação muscular não é dependente de miR-23a no músculo Sol e pode ser regulada por outros mecanismos.

O aumento da expressão dos fatores transcricionais FOXO1 e FOXO3 está envolvido com o metabolismo, apoptose e na progressão do ciclo celular (Carlsson e Mahlapuu, 2002), foi observado em diferentes condições de atrofia (Senf *et al.*, 2008; Lecker *et al.*, 2004; Sacheck *et al.*, 2007) e tem sido demonstrado como reguladores da transcrição de alguns de genes associados atrofia, incluindo MuRF1 e MAFbx (Waddell *et al.*, 2008; Sandri *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004). O FOXO, quando ativado, é desfosforilado, entra no núcleo e atua suprimindo desenvolvimento celular e promovendo a apoptose (Ramaswamy *et al.*, 2002). No nosso experimento observou-se

diminuição da expressão de FOXO3 no grupo I do músculo Sol, sem alteração na expressão de FOXO1 nesse mesmo grupo em ambos os músculos estudados. Esses dados sugerem que FOXO1 e FOXO3 não estão envolvidos na regulação da atrofia muscular nesse modelo de imobilização.

Nagatomo *et al.* (2011) observaram aumento na expressão gênica de FOXO, tanto no músculo Sol quanto Pl de ratos, após atrofia induzida por 3 semanas de suspensão nos membros posteriores. No entanto, não foi observado aumento de FOXO no músculo vasto lateral, tanto em humanos jovens quanto idosos, após 4 semanas de imobilização (Suetta *et al.* 2012). A atividade de transcrição de FOXO pode ser regulada por fatores pós-transcricionais, como a acetilação, ou ainda aumento da expressão da histona acetiltransferase p300, que levaria a inibição da atividade do FOXO em decorrência de imobilização, diminuindo assim a expressão de genes como MAFbx e MuRF1 (Senf *et al.*, 2011). Além disso, a inibição da atividade de transcrição de FOXO atenuou a perda de massa muscular induzida por desuso (Senf *et al.*, 2008; 2010).

A diminuição na expressão gênica de FOXO1, no grupo TF3 no músculo Sol e diminuição no grupo T3 no músculo Pl sugere que essas alterações podem estar sendo causadas pelo exercício resistido e aeróbico respectivamente, ou ainda por outros mecanismos que podem regular a expressão de FOXO1, como por exemplo, o miR-486 que contribui para a manutenção da massa muscular, regulando a atividade de Akt, que inibe a translocação da família FOXO, favorecendo a hipertrofia muscular.

Outro gene que pode estar diretamente ligado às alterações encontradas na expressão do FOXO1 e FOXO3, é o IGF-1, potente sinalizador anabólico no tecido muscular, estimulando a síntese proteica (Barton-Davis *et al.*, 1999; Glass, 2003; Goldspink, 2005). Desta forma, a ativação da via do IGF-1/Akt resulta na redução da translocação do FOXO, enquanto a inibição da via do IGF-1 causa translocação de FOXO para o núcleo, promovendo a supressão do crescimento e favorecendo proteólise (Stitt *et al.*, 2004).

Em nosso experimento, o aumento na expressão de IGF-1 no músculo Sol do grupo I, está de acordo com a diminuição da expressão de FOXO3 nesse mesmo grupo, fato que pode explicar a

expressão de MuRF1 não ter sido aumentada, mesmo esse músculo estando em um processo progressivo de atrofia muscular. O aumento de IGF-1 no grupo I do músculo Sol pode estar relacionado com a diminuição dos miRNAs miR-1, miR-206 e miR-128 que tem sido descritos como reguladores da via de IGF-1.

A diminuição da expressão de miR-1 poderia contribuir para a ativação da via IGF-1/Akt, pois miR-1 inibiu a via do IGF-1/Akt em células C2C12 controlando a expressão de IGF-1 (Elia *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2011; Kukreti *et al.*, 2013) e a inibição do miR-206 aumentou tamanho de miotubos em células C2C12 (Winbanks *et al.*, 2013) em tilápia aumentou a expressão gênica de IGF-1. O miR-128 tem um potencial para aumentar a massa muscular, agindo como um regulador negativo da via de hipertrofia IGF-1/Akt (em revisão Hitachi e Tsuchida, 2014), regulando os genes alvo envolvidos na sinalização da insulina; também modula a proliferação de mioblastos e de miotubos levando a hipertrofia (Motohashi *et al.*, 2013) e a inibição de miR-128 induziu a maturação de miotubos *in vitro* e *in vivo* (Motohashi *et al.*, 2013).

Dessa forma, nossos resultados sugerem que a diminuição na expressão dos miRNAs miR-1 e miR-206 pode ter favorecido o aumento na expressão de IGF-1, possivelmente responsável pela diminuição da expressão de FOXO3 no músculo Sol após imobilização. Como FOXO3 é um regulador de MAFbx e MuRF1, a diminuição na expressão do FOXO3 pode explicar a menor atuação das ubiquitina ligases no músculo Sol durante o processo de atrofia muscular. Tendo em vista que no Pl essas alterações não foram observadas, podemos inferir que esse músculo foi mais afetado pela imobilização, fato que corrobora os nossos achados morfológicos (CSA).

Nossos resultados mostraram também, que os níveis de expressão do miR-128 permaneceram diminuídos após 7 dias, nos animais submetidos aos dois programas de exercícios de recuperação muscular, em contraste com o grupo sem exercício onde os níveis de miR-128 foram semelhante ao grupo C7, no músculo Sol. Apesar desse estudo não ter avaliado os genes alvos do miR-128, os nossos resultados sugerem que os programas de exercício utilizados para a recuperação muscular após a imobilização, foram capazes de regular a expressão deste miRNA no

músculo Sol, e que possivelmente está relacionado com o crescimento muscular observado nesse músculo, mais evidente no grupo submetido ao exercício aeróbico, como demonstrado pela análise da CSA.

O PGC-1 α regula a biogênese mitocondrial e o metabolismo oxidativo, estando mais expressa, principalmente, em músculos com grande concentração de fibras do tipo I (Lin *et al.*, 2002); tem sido descrito como possível regulador da atrofia por desuso, pois a disfunção mitocondrial desempenha um papel importante na indução da atrofia muscular ativando os fatores anabólicos. Camundongos transgênicos, com níveis elevados de expressão de PGC-1 α , foram submetidos a 7 dias de suspensão do membro posterior e não apresentaram alterações metabólicas, mantendo o tamanho do músculo Sol preservado, através da redução de autofagia e degradação proteossoma (Cannavino *et al.*, 2014).

Diminuição na expressão gênica de PGC-1 α tem sido descrita em vários modelos de atrofia muscular, tanto na fase inicial, como na fase tardia do processo de atrofia (Mazzatti *et al.*, 2008; Momken *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012; Sandri *et al.*, 2006). Em nosso experimento, ambos os músculos apresentaram diminuição na expressão gênica de PGC-1 α . Recentemente tem sido sugerido que a alteração em vias de sinalização mitocondrial é suficiente para causar perda de massa muscular em ratos, enquanto que a inibição na alteração dessas vias impede a atrofia muscular (Romanello *et al.*, 2010; Romanello e Sandri, 2010); isso indica que alterações mitocondriais poderiam sustentar o catabolismo muscular em atrofia por desuso. Assim, PGC-1 α pode estar regulando a atrofia muscular no modelo de atrofia utilizado no nosso estudo. Após 3 e 7 dias de recuperação muscular, com e sem exercício, a expressão de PGC-1 α não apresentou alteração em relação ao controle, mostrando que os níveis desse gene se normalizam rapidamente após a retirada do estímulo atrofico.

Além de alterar a expressão dos atrogenes (MAFbx e MuRF-1) e de PGC-1 α , o período de 7 dias de imobilização foi suficiente para aumentar a expressão gênica do 4E-BP1, tanto no músculo Sol como no Pl. Tendo em vista que esse gene está relacionado com a montagem dos

ribossomos (Bodine *et al.*, 2001), e atua como repressor da tradução, o aumento de seus níveis no grupo I de ambos os músculos estudados, indica que nesses músculos pode ter ocorrido supressão/diminuição do processo de tradução, consequentemente, alterando a síntese proteica e favorecendo a atrofia muscular.

Após a retirada do estímulo atrofico os níveis de 4E-BP1 diminuíram e apresentaram-se abaixo dos níveis do grupo C3 no grupo R3 e TF3 no músculo Sol e no grupo R3 no músculo PL. No entanto, a expressão do 4E-BP1 se igualou ao grupo C3 no grupo T3 no Sol, e nos grupos T3 e TF3 no PL, provavelmente, devido ao treinamento ao qual foram submetidos, que acelerou os processos biológicos de homeostase muscular. Após 7 dias de recuperação não foram observadas alterações na expressão desse gene em ambos os músculos estudados.

Outra alteração importante observada em nosso estudo foi na expressão dos MRFS (MyoD e Miogenina), responsáveis por controlar a proliferação e diferenciação das células satélites promovendo a regeneração muscular (Rosenblatt *et al.*, 1994; Lowe e Alway 1999). A atividade das células satélites tem sido mostrada como pré-requisito para o crescimento (Mozdziak *et al.*, 1997) e hipertrofia muscular (Rosenblatt *et al.*, 1994).

MiR-1 e miR-206 regulam a atividade das células satélites do músculo esquelético, inibindo Pax7, um fator de transcrição expresso por células satélite indiferenciadas, necessário para a ativação inicial do MRF MyoD (Rosenberg *et al.*, 2006). O aumento do nível de MyoD vai ativar a expressão de miR-1 e miR-206 que, por sua vez, controlam a expressão de Pax7, estimulando a proliferação e diferenciação celular pela ação da MyoD e Miogenina, respectivamente (Chen *et al.*, 2006;. Chen *et al.*, 2010).

Após a atrofia muscular, vários miRNAs estão desregulados. Onze dias de microgravidade resultou em uma diminuição significativa nos níveis de miRNA miR-206 no músculo gastrocnêmio, mas miR-1 e miR-133a não foram afetados de forma significativa (Allen *et al.*, 2009). Kukreti *et al.* (2013) apresentaram um aumento nos níveis de miR-1 na atrofia induzida por Dex em miotubos e a inibição de miR-1 atenuou a atrofia em miotubos C2C12. O perfil de expressão dos miRNAs

durante atrofia muscular pode variar dependendo do modelo de atrofia: jejum, desnervação, diabetes e caquexia associada ao câncer (Soares *et al.* 2014). Em nosso estudo, não foi observada alteração na expressão gênica de MyoD e Miogenina após imobilização em ambos os músculos estudados. No entanto, os níveis de expressão dos os myomiRs: miR-1, miR-133a e miR-206 foram reduzidos após 7 dias de imobilização no músculo Sol, enquanto no músculo Pl, apenas o miR-133a diminuiu nesse período, sugerindo que as alterações desses myomiRs no processo de atrofia podem variar de acordo com o tipo de músculo estudado.

Em nosso estudo, após de 3 dias de recuperação muscular, os níveis de expressão gênica de MyoD e Miogenina aumentaram apenas nos animais submetidos a exercícios aeróbico e resistido (T3 e TF3), enquanto nos animais não submetidos ao exercício, os níveis de expressão gênica de Miogenina aumentaram apenas após 7 dias de recuperação muscular (R7) no músculo Sol. No músculo Pl não são observadas alterações na expressão desses MRFs em nenhum dos grupos estudados após 3 e 7 dias de recuperação. Corroborando com esses achados, os dois programas de exercício utilizados aceleraram a normalização dos níveis de miR-1 e miR-206 que ocorreu após 3 dias de recuperação, enquanto nos animais sem exercício a normalização dos níveis de miR-1 e miR-206 ocorreu após 7 dias de recuperação muscular no músculo Sol. Os níveis do miR-133a continuaram diminuídos em todos os grupos estudados no músculo Sol após 3 e 7 dias de recuperação, e no músculo Pl mantiveram-se diminuídos apenas nos grupos T3 e TF3 após 3 dias de recuperação e R7 e T7 após 7 dias de recuperação.

Mozdziak *et al.* (2000) demonstraram que a atividade mitótica das células satélites foi maior durante a segunda semana após a retirada do estímulo atrofico (suspensão dos membros posteriores), no músculo Sol de ratos. Darr e Schultz (1987) afirmaram que é provável que o aumento de exigência funcional do músculo estimule a proliferação de células satélites e consequentemente acréscimo de mionúcleos nas fibras musculares.

Os níveis de expressão de miR-1 e miR-133a aumentaram após exposição aguda a um exercício resistido, mas a expressão de miR-133b e miR-206 não alterou em humanos; após 12

semanas de treinamento, o miR-1, miR-133a, miR-133b e miR-206 foram reprimidos (Nielsen *et al.*, 2010). Um único episódio de exercício aeróbico com intensidade moderada aumentou a expressão de diversos miRNAs incluindo miR-1, -133a, 133b (Russell *et al.*, 2013).

O aumento da expressão do gene MyoD e Miogenina e a normalização dos níveis de miR-1 e miR-206 após 3 dias de recuperação nesse estudo, demonstram que os programas de exercício aeróbico e resistido aceleraram a recuperação muscular, uma vez que estes MRFs estão envolvidos com a proliferação e diferenciação celular do músculo (Brack e Rando, 2012), processos que são controlados pelo miR-1 e miR-206 (Miano, 2003;. Kim et al, 2006;. Dey *et al*, 2011). No entanto, aos 7 dias de recuperação muscular, apenas o exercício aeróbico promoveu uma recuperação total da AST no músculo Sol demonstrando que este tipo de exercício é mais propenso a promover a recuperação de massa muscular após a atrofia muscular por imobilização. No grupo sem exercício, a recuperação muscular foi mais lenta, fato demonstrado pela expressão de Miogenina e de miR-1 e miR-206. Dessa forma, nossos achados sugerem que a expressão de miR-1 e miR-206 e dos MRFs: MyoD e Miogenina são sensíveis ao exercícios aeróbico e resistido após a atrofia muscular por imobilização no músculo Sol.

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que a imobilização por 7 dias induziu a atrofia nos músculos sóleo e plantar, sendo mais acentuada nas fibras glicolíticas do músculo plantar.

O exercício aeróbico mostrou-se mais eficiente na recuperação do músculo sóleo.

O exercício aeróbico regulou a expressão dos myomiRs miR-1/-206 durante a recuperação do músculo sóleo, possivelmente através da ação dos MRFs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadi A, Glover EI, Isfort RJ, Raha S, Safdar A, Yasuda N, Kaczor JJ, Melov S, Hubbard A, Qu X, Phillips SM, Tarnopolsky M. (2009) Limb immobilization induces a coordinate down-regulation of mitochondrial and other metabolic pathways in men and women. *PLoS One*. 4(8):e6518.
- Aguiar AF, Vechetti-Junior IJ, Souza RWA, Castan EP, Milanezi-Aguiar RC, Padovani CR, Carvalho RF, Dal Pai-Silva M (2013) Myogenin, MyoD and IGF-I Regulate Muscle Mass but not Fiber-type Conversion during Resistance Training in Rats. *Int J Sports Med*; 34: 293–301
- Allen DL, Bandstra ER, Harrison BC, Thorng S, Stodieck LS, Kostenuik PJ, Morony S, Lacey DL, Hammond TG, Leinwand LL, Argraves WS, Bateman TA, Barth JL (2009) Effects of spaceflight on murine skeletal muscle gene expression. *J Appl Physiol* 106:582–595.
- Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9: 277-279.
- Aoki MS, Miyabara EH, Soares AG, Salvini TF, Moriscot (2006) AS Cyclosporin-A does not affect skeletal muscle mass during disuse and recovery *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39: 243-251
- Appell HJ (1986). Skeletal muscle atrophy during immobilization. *Int J Sports Med* 7(1): 1-5.
- Baar K, Nader N, Bodine S (2006). Resistance exercise, muscle loading/unloading and the control of muscle mass. *Bioch* 42:61-74.
- Bärr A, Pette D (1988) Three fast myosin heavy chain in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 233:153-155.
- Barany M (1967) ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 50:197-218.
- Barton-Davis ER, Shoturma DI, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL (1998). Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (26): 15603-15607.
- Barton-Davis ER, Shoturna DI, Sweeney HL (1999). Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 167(4):301-305.
- Bickel CS, Slade J, Mahoney ED, Haddad D, Dudley A, Adams GR (2005). Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. *J Appl Physiol* 98:482–488.
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD (2001) Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 3:1014–1019.
- Bodine SC, Baehr LM, (2014) Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1 *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307: E469–E484.

- Bonaldo P, Sandri M. (2013) Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy *Dis Model Mec* 6(1):25-39.
- Brack AS; Rando TA (2012) Tissue-specific stem cells: lessons from the skeletal muscle satellite cell. *Cell Stem Cell* 10: 504–514.
- Burke DG, Candow DG, Chilibeck PD, MacNeil LG, Roy BD, Tarnopolsky MA, Ziegenfuss T (2008). Effect of creatine supplementation and resistance-exercise training on muscle insulin-like growth factor in young adults. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 18(4):389-98.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT, (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 55: 611-622.
- Butkus JA, Brogan RS, Giustina A, Kastello G, Sothmann M, Wehrenberg WB (1995). Changes in the growth hormone axis due to exercise training in male and female rats: secretory and molecular responses. *Endocrinology* 136(6):2664-70.
- Caiozzo VJ, Haddad F, Baker M.J, Herrick RE, Prietto N, Baldwin KM (1996) Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 81(1): 123-132.
- Callis TE, Deng Z, Chen JF, Wang DZ (2008). Muscling through the microRNA world. *Exp. Biol. Med.* 233: 131–138.
- Campos GE, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray TF, Ragg KE, Ratamess NA, Kraemer WJ, Staron RS (2002) Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol* 88:50–60.
- Cannavino J, Brocca L, Sandri M, Bottinelli R, Pellegrino MA (2014) PGC1- α over-expression prevents metabolic alterations and soleus muscle atrophy in hindlimb unloaded mice *J Physiol* 592(20): 4575–4589
- Carlsson P, Mahlapuu M (2002). Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev. Biol.* 250, 1–23.
- Centner T, Yano J, Kimura E, McElhinny AS, Pelin K, Witt CC, Bang M-L, Trombitas K, Granzier H, Gregorio CC, Sorimachi H, Labeit S (2001) Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol* 306:717–726
- Chargé SBP, Rudnicki MA (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84:209-238.
- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ, (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* 38: 228-233.
- Chen JF, Tao Y, Li J, Deng Z, Yan Z, Xiao X, Wang DZ, (2010) microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J. Cell Biol.* 190: 867-879.

- Cunha TS, Tanno AP, Moura MJCS, Marcondes FK (2005) Influence of high-intensity exercise training and anabolic androgenic steroid treatment on rat tissue glycogen content. *Life Sci* 77:1030–1043.
- Da Silva CA, Guirro RR, Polacow ML, Cancelliero KM, Durigan JL (2006) Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. *Braz J Med Biol Res* 39(7): 979-985.
- Darr KC, Schultz E (1987) Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 63:1816–1821.
- Davidson PK, Gallagher IJ, Hartman JW, Tarnopolsky MA, Dela F, Helge JW, et al. (2011). High responders to resistance exercise training demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNA expression. *J. Appl. Physiol.* 110: 309–317.
- Deasy BM, Jankowski RJ, Huard J (2001). Muscle-derived stem cells: characterization and potential for cell-mediated therapy. *Blood Cells Mol Dis* 27(5): 924-933.
- Dey BK, Gagan J, Dutta A (2011). miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7. *Mol. Cell. Biol.* 31: 203–214.
- Dirks ML, Wall BT, Snijders T, Ottenbros CLP, Verdijk LB, van Loon LJC (2014). Neuromuscular electrical stimulation prevents muscle disuse atrophy during leg immobilization in humans. *Acta Physiol. (Oxf)* 210:628–641.
- Doench, J.G., Sharp, P.A., 2004. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18, 504-511.
- Drummond MJ, Dreyer HC, Pennings B, Fry CS, Dhanani S, Dillon EL, et al. (2008a). Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging. *J. Appl. Physiol.* 104: 1452–1461.
- Durieux AC, Amirouche A, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Pasdeloup M, Mouret C, Bigard X, Peinnequin A, Freyssenet D (2007). Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression. *Endocrinology* 148:3140–3147
- Egan B, Zierath JR (2013) Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation *Cell Metabolism* 17(2): 162-184.
- Eisenberg I, Eran A, Nishino I, Moggio M, Lamperti C, Amato AA, et al. (2007). Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 17016–17021.
- Elia L, Contu R, Quintavalle M, Varrone F, Chimenti C, Russo MA, et al. (2009). Reciprocal regulation of microRNA-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions. *Circulation* 120:, 2377–2385.
- Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP (2006) miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* 3: 87-98.

- Federeck MN, Rupert JL (2008). Myostatin inhibition: a potential performance enhancement strategy? *J Med Sci Sports* 18:123–131.
- Fielitz J, Kim MS, Shelton JM, Latif S, Spencer JA, Glass DJ, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN (2007) Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *J Clin Invest* 117:2486–2495
- Flynt AS, Li N, Thatcher EJ, Solnica-Krezel L, Patton JG (2007) Zebrafish miR-214 modulates Hedgehog signaling to specify muscle cell fate. *Nat Genet* 39: 259-63.
- Foletta VC, White LJ, Larsen AE, Léger B, Russell AP (2011) The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Eur J Physiol* 461:325–335.
- Gilson H, Schakman O, Combaret L, Lause P, Grobet L, Attaix D, Ketelslegers JM, Thissen JP (2007). Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology* 148:452–460
- Glass DL (2003). Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trend Mol med* 9(8):344- 350.
- Glass DJ (2005) Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 1974–84.
- Glickman M, Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteosome pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82: 373-423.
- Goldspink DF, Cox VM, Smith SK, Eaves LA, Osbaldeston NJ, Lee DM (1995). Muscle growth in response to mechanical stimuli. *Am J Physiol* 268:E288-E297.
- Goldspink G (2005). Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. *Physiology* 20:232-238.
- Goodman LA (1964). Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Annals of Mathematical Statistics* 35(2):716-725.
- Goodman LA (1965). On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics* 7(2):247-254.
- Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, et al. (2001) Atrogen-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14440-5.
- Hamrick MW, Herberg S, Arounleut P, He HZ, Shiver A, Qi RQ, et al. (2010). The adipokine leptin increases skeletal muscle mass and significantly alters skeletal muscle miRNA expression profile in aged mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400: 379–383.
- Hawke TJ, Garry DJ (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 9(2):534-551.
- Hawley JA (2002). Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training. *Clin Exp Pham Physiol* 29: 218-222.

- Heinemeier KM, Olesen JL, Schjerling P, Haddad F, Langberg H, Baldwin KM, Kjaer M (2007). Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types. *J Appl Physiol* 102: 573–581.
- Hirner S, Krohne C, Schuster A, Hoffmann S, Witt S, Erber R, Sticht C, Gasch A, Labeit S, Labeit D (2008) MURF1-dependent regulation of systemic carbohydrate metabolism as revealed from transgenic mouse studies. *J Mol Biol* 379:666–677.
- Hitachi K, Tsuchida K. (2014) Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. *Front. Physiol.* 4: 408.
- Huang MB, Xu H, Xie SJ, Zhou H, Qu LH (2011). Insulin-like growth factor-1 receptor is regulated by microRNA-133 during skeletal myogenesis. *PLoS ONE* 6:e29173.
- Huxley HE. (1969) The mechanism of muscular contraction. *Science* 164: 1356–65.
- Jogo M, Shiraishi S, Tamura TA (2009) Identification of MAFbx as a myogenin-engaged F-box protein in SCF ubiquitin ligase. *FEBS Lett* 583:2715–2719
- Jones SW, Hill RJ, Krasney PA, O’Conner B, Peirce N, Greenhaff PL (2004) Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J* 18:1025–1027.
- Kadi F, Bonnerud P, Eriksson A, Thornell LE (2000) The expression of androgen receptors in human neck and limb muscles: effects of training and self-administration of androgenic-anabolic steroids. *Histochem Cell Biol* 113(1): 25-29.
- Kelly AM, Rubinstein NA (1994) The diversity of muscle fiber types and its origin during development. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C. *Myology* (2nd ed). McGraw-Hill, London :119-133.
- Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, Malhotra A, Dutta A (2006) Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J Cell Biol* 174: 677-87.
- Krawiec BJ, Frost RA, Vary TC, Jefferson LS, Lang CH (2005) Hindlimb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E969–E980
- Kukreti H, Amuthavalli K, Harikumar A, Sathiyamoorthy S, Feng PZ, Anantharaj R, et al. (2013). Muscle-specific MicroRNA1 (miR1) targets heat shock protein 70 (HSP70) during Dexamethasone-mediated Atrophy. *J. Biol. Chem.* 288: 6663–6678.
- Lagirand-Cantaloube J, Cornille K, Csibi A, Batonnet-Pichon S, Leibovitch MP, Leibovitch SA (2009) Inhibition of atrogen-1/MAFbx mediated MyoD proteolysis prevents skeletal muscle atrophy in vivo. *PLoS ONE* 4:e4973
- Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, et al. (2004) Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18:39–51.

- Leung AK, Sharp PA, (2007) microRNAs: a safeguard against turmoil? *Cell* 130: 581-585.
- Li H, Capetanaki Y (1993) Regulation of the mouse desmin gene: transactivation by MyoD, myogenin, MRF4 and Myf5. *Nucleic Acids Res* 21:335–343.
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM. (2002) Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418:797–801.
- Lin Z, Murtaza I, Wang K, et al. (2009) miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:12103–12108.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-8.
- Liu M, Stevens-Lapsley JE, Jayaraman A, Ye F, Conover C, Walter GA, Bose P, Thompson FJ, Borst SE, Vandenborne K (2010). Impact of treadmill locomotor training on skeletal muscle IGF-1 and myogenic regulatory factors in spinal cord injured rats. *Eur J Appl Physiol* DOI 10.1007/s00421-010-1392-z.
- Liu N, Williams AH, Maxeiner JM, Bezprozvannaya S, Shelton JM, Richardson JA, et al. (2012). microRNA-206 promotes skeletal muscle regeneration and delays progression of Duchenne muscular dystrophy in mice. *J. Clin. Invest.* 122: 2054–2065.
- Lowe DA, Always SE (1999). Stretch-induced myogenin, MyoD, and MRF4 expression and acute hypertrophy in quail slow-tonic muscle are not dependent upon satellite cell proliferation. *Cell Tissue Res* 296: 531-539.
- Lowey S, Slayter HS, Weeds AG, Baker H. (1969) Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J. Mol. Biol.* 42: 1–29.
- Machida S, Booth FW (2004). Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity. *Med Sci Sports Exerc* 36(1): 52-59
- Magaudda L, Mauro DD, Trimarchi F, Anastasi G (2004). Effects of physical exercises on skeletal muscle fiber: ultrastructural and molecular aspects. *Basic Appl Myol* 14(1):17- 21.
- Manchado FB, Gobatto CA, Contarteze RVL, Papoti M, de Mello MAR (2005) Maximal Lactate Steady State In Running Rats. *JEPonline* 8(5):29-35.
- Martin TP, Edgerton VR, Grindeland RE (1998) Influence of space flight on rats skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 6:2318-2325.
- Matsakas A, Friedel A, Hertrampf T, Diel P (2005). Short-term endurance training results in a muscle-specific decrease of myostatin mRNA content in the rat. *Acta Physiol Scand* 2005, 183, 299–307
- Mazzatti DJ, Smith MA, Oita RC, Lim FL, White AJ, Reid MB (2008). Muscle unloading-induced metabolic remodeling is associated with acute alterations in PPAR δ and UCP-3 expression. *Physiol Genomics* 34: 149–161.

- McCarthy JP, Pozniak MA, Agre JC (2002). Neuromuscular adaptations to concurrent strength and endurance training. *Med Sci Sports Exerc* 34: 511-519.
- McCarthy JJ, Esser KA, Andrade FH (2007) MicroRNA-206 is overexpressed in the diaphragm but not the hindlimb muscle of mdx mouse. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C451-7.
- Megeney LA, Rudnicki MA (1995) Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol* 73(9-10):723-732.
- Miano JM (2003). Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35: 577–593.
- Miyazaki M, Esser KA. (2009) Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals *J Appl Physiol* 106(4):1367-73.
- Momken I, Stevens L, Bergouignan A, Desplanches D, Rudwill F, Chery I, Zahariev A, Zahn S, Stein TP, Sebedio JL, Pujos-Guillot E, Falempin M, Simon C, Coxam V, Andrianjafiniony T, Gauquelin-Koch G, Picquet F & Blanc S (2011). Resveratrol prevents the wasting disorders of mechanical unloading by acting as a physical exercise mimetic in the rat. *FASEB J* 25: 3646–3660.
- Moraska A, Deak T, Spencer RL, Roth D, Fleshner M (2000). Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279(4): R1321–R1329.
- Mozdziak PE, Pulvermacher PM, Schultz E (2000). Unloading of juvenile muscle results in a reduced muscle size 9 wk after reloading. *J. Appl. Physiol.* 88:158–164.
- Mozdziak PE, Schultz E, Cassens RG (1997). Myonuclear accretion is a major determinant of avian skeletal muscle growth. *Am. J. Physiol.* 272:C565–571.
- Motohashi N, Alexander MS, Shimizu-Motohashi Y, Myers JA, Kawahara G, Kunkel LM (2013). Regulation of IRS1/Akt insulin signaling by microRNA-128a during myogenesis. *J. Cell Sci* 126, 2678–2691.
- Murre C, Mccaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Yan JN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, Weintraub H, Baltimore D (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58:537-544.
- Nakasa T, Ishikawa M, Shi M, Shibuya H, Adachi N, Ochi M (2010). Acceleration of muscle regeneration by local injection of muscle-specific microRNAs in rat skeletal muscle injury model. *J. Cell. Mol. Med.* 14: 2495–2505.
- Nagatomo F, Fujino H, Kondo H, Suzuki H, Kouzaki M, Takeda I, Ishihara A (2011) PGC-1 α and FOXO1 mRNA levels and fiber characteristics of the soleus and plantaris muscles in rats after hindlimb unloading. *Histol Histopathol* 26: 1545-1553
- Naguibneva I et al. (2006) The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol* 8: 278-84.

- Okamoto T, Torii S, Machida S (2011) Differential gene expression of muscle-specific ubiquitin ligase MAFbx/Atrogin-1 and MURF1 in response to immobilization-induced atrophy of slow-twitch and fast-twitch muscles. *J Physiol Sci* 61:537–546.
- Oishi Y, Ogata T, Yamamoto K, Terada M, Ohira T, Ohira Y, Taniguchi K, Roy RR (2008) Cellular adaptations in soleus muscle during recovery after hindlimb unloading *Acta Physiol* 192:381–395.
- Pattison JS, Folk LC, Madsen RW, Booth FW (2003). Selected Contribution: Identification of differentially expressed genes between young and old rat soleus muscle during recovery from immobilization-induced atrophy. *J Appl Physiol* 95: 2171–2179.
- Perbellini R, Greco S, Sarra-Ferraris G, Cardani R, Capogrossi MC, Meola G, et al. (2011). Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul. Disord.* 21: 81–88.
- Pette D, Staron RS (2000) Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 50:500-509.
- Pette D, Staron RS (2001) Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem cell biol* 115:359-372.
- Phelan JN, Gonyea WJ (1997). Effect of radiation on satellite cell activity and protein expression in overloaded mammalian skeletal muscle. *Anat Rec* 247:179-188.
- Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM. (2003) Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 423: 550–5.
- Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers WR (2002). A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell* 2, 81–91.
- Rezen T, Kovanda A, Eiken O, Mekjavic IB, Rogelj B (2014) Expression changes in human skeletal muscle miRNAs following 10 days of bed rest in young healthy males *Acta Physiol* 210: 655–666.
- Romanello V, Guadagnin E, Gomes L, Roder I, Sandri C, Petersen Y, Milan G, Masiero E, Del Piccolo P, Foretz M, Scorrano L, Rudolf R & Sandri M (2010). Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *EMBO J* 29: 1774–1785.
- Romanello V & Sandri M (2010). Mitochondrial biogenesis and fragmentation as regulators of muscle protein degradation. *Curr Hypertens Rep* 12: 433–439.
- Rosenblatt JD, Yong D, Parry DJ. (1994). Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle. *Muscle Nerve* 17:608–613.
- Rosenberg MI, Georges SA, Asawachaicharn A, Analau E, Tapscott SJ. (2006) MyoD inhibits Fstl1 and Utrn expression by inducing transcription of miR-206. *J. Cell Biol.* 175: 77–85.
- Rudnicki MA, Jaenisch R (1995) The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *Bioessays.* 17(3):203-9.

- Russell AP, Lamon S, Boon H, Wada S, Guller I, Brown EL, et al. (2013). Regulation of miRNAs in human skeletal muscle following acute endurance exercise and short term endurance training. *J. Physiol.* 591: 4637–4653.
- Sacheck JM, Hyatt JP, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, et al. (2007) Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21: 140–55.
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL (2004) Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117:399–412
- Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, Goldberg AL, Spiegelman BM (2006) PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription *PNAS* 103(44):16260–16265.
- Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M (2007) MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res* 100: 416-24.
- Schiaffino S, Reggiani C (1994) Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* 77(2):493–501.
- Senf SM, Dodd SL, McClung JM, Judge AR. (2008) Hsp70 overexpression inhibits NF-kappaB and Foxo3a transcriptional activities and prevents skeletal muscle atrophy. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*; 22:3836–45.
- Senf SM, Dodd SL, Judge AR (2010) FOXO signaling is required for disuse muscle atrophy and is directly regulated by Hsp70. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 298:C38–45.
- Senf SM, Sandesara PB, Reed SA, Judge AR. (2011) p300 acetyltransferase activity differentially regulates the localization and activity of the FOXO homologues in skeletal muscle. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 300: C1490–501.
- Sharma M, Juvvuna PK, Kukreti H, McFarlane C (2014) Mega roles of microRNAs in regulation of skeletal muscle health and disease *Front Physiol.* 26 (5): 239.
- Snijders T, Wall BT, Dirks ML, Senden JMG, Hartgens F, Dolmans J, et al. (2014). Muscle disuse atrophy is not accompanied by changes in skeletal muscle satellite cell content. *Clin. Sci. (Lond).* 126:557–566.
- Soares RJ, Cagnin S, Chemello F, Silvestrin M, Musaro A, De Pitta G, Lanfranchi G, Sandri M (2014) Involvement of MicroRNAs in the Regulation of Muscle Wasting during Catabolic Conditions. *The Journal of Biological Chemistry*, 289 (32): 21909–21925.
- Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Fry AC, Murray JD, Campos GE (1999) Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem Cell Biol* 111:117-123.

- Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ (2004) The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell* 14:395–403
- Suetta C, Frandsen U, Jensen L, Jensen MM, Jespersen JG, Hvid LG, et al. (2012). Aging affects the transcriptional regulation of human skeletal muscle disuse atrophy. *PLoS ONE* 7:e51238.
- Sun Y, Ge Y, Drnevich J, Zhao Y, Band M, Chen J (2010). Mammalian target of rapamycin regulates miRNA-1 and follistatin in skeletal myogenesis. *J. Cell Biol.* 189: 1157–1169.
- Talmadge RJ, Roy RR (1993) Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol* 75(5): 2337-2340.
- Talmadge RJ (2000) Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. *Muscle Nerve*, 23 (5): 661-679.
- Trappe S, Harber M, Creer A, Gallagher P, Slivka D, Minchev K, Whitsett D (2006). Single muscle fiber adaptations with marathon training. *J Appl Physiol* 101(3): 721-727.
- van Rooij E et al. (2007) Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 316: 575-9.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*; 3(7).
- Wada S, Kato Y, Okutsu M, Miyaki S, Suzuki K, Yan Z, et al. (2011). Translational suppression of atrophic regulators by microRNA-23a integrates resistance to skeletal muscle atrophy. *J. Biol. Chem.* 286: 38456–38465.
- Waddell DS, Baehr LM, van den Brandt J, Johnsen SA, Reichardt HM, Furlow JD, et al. (2008) The glucocorticoid receptor and FOXO1 synergistically activate the skeletal muscle atrophy-associated MuRF1 gene. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 295:E785–97.
- Walsh FS, Celeste AJ (2005). Myostatin: a modulator of skeletal-muscle stem cells. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 6):1513-7.
- Wang Y, Pessina JE (2013) Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16(3):243-50.
- Wheeler MT, Snyder EC, Patterson MN, Swoap SJ (1999) An E-box within the MHC IIB gene is bound by MyoD and is required for gene expression in fast muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 276: C1069-C1078.
- Winbanks CE, Beyer C, Hagg A, Qian H, Sepulveda PV, Gregorevic P (2013) miR-206 represses hypertrophy of myogenic cells but not muscle fibers via inhibition of HDAC4. *PLoS ONE* 8:e73589.

Yuasa K, Hagiwara Y, Ando M, et al. (2008) MicroRNA-206 is highly expressed in newly formed muscle fibers: implications regarding potential for muscle regeneration and maturation in muscular dystrophy. *Cell Structure and fuction*. 33: 163–9.

Zar JH (1999) *Biostatistical analysis*, 4th ed. Prentice-Hall New Jersey, 633p.

MANUSCRITO

MicroRNAs expression during skeletal muscle atrophy and recovery

Raquel Santilone Bertaglia¹, Ivan José Vechetti Júnior¹, Warlen Piedade¹, Bruno Duran¹, Robson Carvalho¹ and Maeli Dal-Pai-Silva¹

¹Sao Paulo State University, Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu, São Paulo, Brazil

Abstract

MicroRNAs are short non-coding RNAs involved in the post-transcriptional regulation of gene expression, accelerating degradation of mRNA and/or inhibiting translation. The myomiRs are miRNAs enriched in the muscle tissue and are differentially expressed during the myogenesis, development, degeneration, atrophy and after exercise training programs. The purposes of the present study were to evaluate the expression levels of miR-1, miR-23a, miR-128, miR-133a and miR-206 in soleus muscle after immobilization and during muscle recovery with and without exercise training (aerobic and resistance). After 7 days of immobilization, the soleus muscle presented reduced levels of all the miRNAs studied and increased of MAFbx. After 3 days of muscle recovery the levels of miR-1 and miR-206 were normalized accompanied by increased MyoD expression, only in the groups subjected to both exercises; myogenin expression was high only in the group subjected to the aerobic exercise. After 7 days of muscle recovery the level of miR-128 were decreased only in the animals submitted to both exercises and myogenin was increased in muscle that recovered without exercise and in the muscle of aerobic exercise group. Our findings showed that aerobic exercise regulated the myomiRs miR-1 / -206 levels in the soleus muscle recovery after atrophy, accelerating the muscle cell differentiation through the MRFs.

Keywords: miRNA, skeletal muscle, muscle atrophy, exercise

1. Introduction

Skeletal muscle is a highly plastic tissue composed by different muscle fiber types (Schiaffino and Reggiani, 1994; Pette and Staron, 2000), that is able to change their phenotypic characteristics in response to stimuli that modify the metabolic and functional demands, the mechanical loading and substrate supply (Pette and Staron, 2000; Magaúda et al., 2004).

A key feature of muscle plasticity is the intrinsic transcriptional regulation of genes involved in protein synthesis (increase in muscle mass) or protein degradation (muscle atrophy) (Matsakas et al., 2005; Baar et al., 2006). The increase in muscle mass occurs in response to hormones/growth factors action and/or by increased loading (Louis et al., 2007; Davis and Fiorotto, 2009). Skeletal muscle atrophy occurs as a result of changes in the balance between catabolic and anabolic processes resulting in the loss of muscle mass (protein breakdown exceeds protein synthesis); this fact can occur in consequence of different physiological and pathological conditions (cancer, diabetes, congestive heart failure, neurodegeneration, muscular dystrophies, aging and limb immobilization). In these situations, skeletal muscle mass is lost, leading to muscle weakness, inactivity and increased mortality (Bodine and Baehr, 2014).

Muscle atrophy is mediated mainly by two important muscle-specific E3 ubiquitin ligases, MAFbx and Murf-1, responsible for the increased protein degradation in several models of muscle disuse (Bodine et al., 2001; Gomes et al., 2001; Foletta et al., 2011) and muscle regeneration occurs by the activity of the satellite cells (SC), a population of undifferentiated myogenic cells located between the basal lamina and the plasma membrane of muscle fibers (Collins et al., 2005; Mauro, 1961). When SCs are activated, they proliferate, differentiate and fuse to form multinucleated myotube and ultimately mature to contribute with muscle regeneration (Soleimani et al., 2012). A network of transcription factors and myogenic regulatory factors (MRFs) controls satellite cell proliferation, and differentiation. Upon activation and proliferation, Myf5 expression is upregulated, along with MyoD and during terminal differentiation myogenin is upregulated, along with MRF4, both factors being required for terminal myogenic differentiation (reviewed in Brack and Rando, 2012).

MicroRNAs (miRNAs) are short non-coding RNAs (~22 nucleotides) involved in the post-transcriptional regulation of gene expression, accelerating degradation of mRNA and/or inhibiting the translation (Bartel, 2009). The myomiRs (miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208, miR-208b, miR-486 and miR-499), are miRNAs network enriched in the muscle tissue that have a central role in the regulation of skeletal muscle plasticity. These miRNAs are differentially regulated during myogenesis, development, degeneration and atrophy and some studies have also

demonstrated a potential role of myomiRs during exercise (Rao et al., 2006; McCarthy and Esser, 2007, Callis et al., 2008; Davidsen et al., 2011; Nielsn et al., 2010; Russell et al., 2013, Sharma et al., 2014

In addition to the myomiRs, miR-128 also is involved with myogenesis represses myoblast proliferation (Chen et al., 2006; Sun et al., 2010; Motohashi et al., 2013) and recently, miR-23a has been described as regulator of muscle atrophy through post-transcriptional regulation of both MAFbx and MuRF1 and plays a key role in protection against skeletal muscle atrophy (Wada et al., 2011).

Given the importance of miRNAs to act on the skeletal muscle plasticity and that little is known about the role of these miRNAs in muscle recovery after atrophy the aim of the present study was to evaluate the expression levels of miR-1, miR-23a, miR-128, miR-133a and miR-206 in skeletal muscle after atrophic stimulus by immobilization and during muscle recovery with aerobic and resistance exercises.

2. Methods

2.1 Animal care

The experimental protocols were approved by the Biosciences Institute Ethics Committee, UNESP, Botucatu, SP, Brazil (Protocol No. 311-CEEA). Male Wistar rats (3 mo of age) were housed in polypropylene cages in a temperature-controlled room (22–24 °C) under a 12-h light dark cycle with food and water ad libitum. To perform the experiment, the animals were divided into 10 experimental groups (n=8): control animals 1 week (C); immobilized animals week 1 (I); control animals 3 or 7 days (C3 and C7, respectively); immobilized and recovered animals by 3 or 7 days (R3 and R7, respectively); immobilized and underwent to aerobic exercise animals for 3 or 7 days (AE3 and AE7, respectively); immobilized and underwent to the resistance exercise animals for 3 or 7 days (RE3 and RE7, respectively).

2.2 Hindlimb immobilization

The hindlimb immobilization process was performed according to previously described and adapted procedure (Frimel, 2005). Briefly, the animals of groups I, R3, AE3, RE3, R7, AE7 and RE7 were anesthetized with a intraperitoneal injection of ketamine (50 mg/kg, ip) and xylazine (10 mg/kg, ip). Once anesthetized, both the hindlimbs of the animals were fixed with a plaster bandage fast drying. The extent of the immobilization was the hip to the ankle, so that the soleus

muscle remains in a neutral position during the 7 days of immobilization to promote muscle atrophy (Appell, 1986; Da Silva et al., 2006).

2.3 Training Protocol

After the immobilization period, the animals of the groups R3 and R7 were kept in cages for muscle recovery and the animals of the groups AE3, AE7, RE3 and RE7 underwent a program of aerobic and strength training to muscle recovery by 3 and 7 days, respectively. The animals in the groups C3, C7, R3 and R7 were kept in shallow water throughout the training period. Aerobic and resistance exercise training were used in an attempt to enhance the process of muscle recovery after muscle atrophy. At the end of the experiment, immediately following euthanasia, soleus muscle were weighed, quickly frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C.

2.3.1 Aerobic training

The aerobic training (swimming) bouts were individually performed in an aquarium (length $\times$ width $\times$ depth: 100 $\times$ 50 $\times$ 50 cm) subdivided into 4 compartments and filled with 40 cm of water at 28-30° C. The animals in the groups AE3 and AE7 were underwent to a swimming aerobic training program for 3 and 7 days, respectively. Initially, the animals completed 5 sessions to adapt to the water in a progressive volume (0 to 15 min.) and intensity (expressed as a load of 0 to 2% of body weight). To define appropriate intensity training, a test for obtaining anaerobic threshold was performed according to previously described (Manchado et al., 2006). This test is characterized by the inflection point of the blood lactate curve and corresponds to the limit of the metabolic transition from aerobic to anaerobic predominance effort. Thus, after determining the anaerobic threshold of animals, volume (time) and intensity (overload) training took 20 min, with 3% of BW (anaerobic threshold) for 3 (AE3) and 7 (AE7) days of training. The training sessions were performed at the same time of day, between 2 and 4 pm.

2.3.2 Resistance training

Resistance training was based on the protocol described by Cunha (2005). Initially, the animals underwent a one- week of training to acclimatize them to the water and training protocol. At this stage, the animals jumped into a vat containing 38 cm of water with a temperature between 28-32°C. The depth was appropriate for that the animal could breathe on the surface of the water during successive jumps. The jump was recorded only when the animals could jump up to the water surface in successive movements. The adaptation process was gradual with increasing the number of sets (2 to 4) and repetitions (5 to 10), supporting an overhead of 50 % of body weight added to a

vest placed on the animal. After the acclimatizing period and to ensure the same training intensity among animals, the charges were adjusted using the one repetition maximum test (1RM) described by Kraemer et al. (2002). Subsequently, the animals were submitted to 3 (RE3) or 7 (RE7) days of strength training after atrophic stimulus. The training was performed of 3 sets of 10 jumps using 60% of 1RM which corresponds to a range of strength training (Kraemer et al., 2002). The training sessions were performed at the same time of day, between 2 and 4 pm.

2.4 Anatomical data

During the whole period of the experiment were monitored daily, body weight (BW) and feed intake of animals. The SOL and PL muscles was collected, weighed and submit to morphological, biochemical, histochemical and molecular analyzes. Additionally, two parameters were used to evaluate the rate of muscle atrophy/hypertrophy: muscle weight (mg) and muscle fiber cross sectional area (CSA) (μm^2).

2.5 Histochemical and morphometric analysis

Histological sections (12 μm) were obtained in a cryostat (JUNG CM1800, Leica Germany) to determine muscle fiber-type frequency and cross sectional area (CSA), using myofibrillar adenosine triphosphatase (mATPase) histochemistry (Staron et al., 1999). Muscle fiber types were classified as Types I, IIC, and IIA in SOL and I, IIC, IIA, IID and IIB in PL muscles (Staron et al. 1999) (Fig. 1). Fiber CSA for each fiber type, and fiber-type frequencies were determined using Image Analysis System Software (Leica, Germany). These parameters were calculated in four random fields per animal using a 20x objective.

2.6 RNA isolation

The RT- qPCR experiments were performed following the guidelines of MIQE: Minimum Information for Publication of Quantitative Real- Time PCR Experiment (Bustin et al., 2009). Total RNA was isolated from SOL and PL muscles by homogenization using using of 3.2mm in 1 ml of TRIzol Reagent (Invitrogen, USA). Total RNA were solubilized in nuclease-free H₂O, and treated with DNase I (Invitrogen, USA) to remove genomic DNA contamination. RNA purity was ensured by obtaining a 260/280 nm OD ratio of 2.0 using a NanoVue Plus spectrophotometer (GE HealthCare, USA), and integrity assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) (Fleige and Pfaffl, 2006). For each sample of mRNA, cDNA was synthesized from 2 μg of total RNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.7 Detection of mRNAs

The expression levels of mRNA were detected from two microliters of cDNA, corresponding to 20 ng of total RNA, from the Reverse transcription reaction, and the PCR amplification product were performed at QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Life Technologies, USA), according to manufacturer's recommendations. Cycling conditions were as follows: 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. For the MuRF, MAFbx, MyoD, myogenin, HPRT, PpIa and PpIb mRNA, cDNA samples were amplified by Power SYBR Green PCR master mix (Life technologies, USA) in a final volume of 25 µl. Primer sequences were designed using the and are listed in the Table 1. Melting dissociation curves and agarose gel electrophoresis were performed to confirm that only a single product was amplified. Relative gene expression was calculated using the Comparative CT Method (2- $\Delta\Delta C_t$) (Livak and Schmittgen 2001) by Data Assist 2.0 (Life Technologies). Three reference genes (HPRT, PpIa and PpIb) were selected to normalize the expression levels and the most stable genes (HPRT and PpIa) were obtained using geNorm (version 3.5, written by Vandesompele et al. 2002).

Table 1. Oligonucleotide primers used for Real-Time PCR amplification of reverse transcribed RNA

Gene	Accession No		Sequence (5' – 3')
MyoD	NM_176079.1	R	GAAGGCAGGGCTTAAGTGTG
		F	TTTTTCATGCGACTCACAGC
Myogenin	NM_017115.2	R	ATAGAAGTGGGGCTCCTGGT
		F	GTCTTTTCCGACCTGATG
MAFbx	NM_133521	R	GGATCTGCCGCTCTGAGAAGT
		F	GACCTGCATGTGCTCAGTGAAG
MuRF1	NM_080903	R	GTGAAGTTGCCCCCTTACAA
		F	TGGAGATGCAATTGCTCAGT
PpIa	NM_017101.1	R	TGCCTTCTTTCACCTTCCCAA
		F	TGGCAAATGCTGGACCAAAC
PpIb	NM_022536.1	R	AGCAAAAGGAAGACGACGG
		F	TCTCGGAGCGCAATATGAAGG
HPRT	NM_012583	R	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC
		F	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC

MAFbx: Muscle Atrophy F-box; MuRF1: Muscle RING Finger 1; PpIa: peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A); PpIb: peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B); HPRT: hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase

2.8 Detection of miRNAs

The expression levels of miRNAs were measured using TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life Technologies, USA) and TaqMan® MicroRNA Assays (Life Technologies, USA), for miR-1, miR-23a, miR-128, miR-133a, and miR-206 (Table 2) according to the manufacturer's directions. The quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using the QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Life Technologies, USA). Cycling conditions were as follows: 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 30 s, and the reactions were run in duplicate. Relative quantification of expression was performed by the 2- $\Delta\Delta C_t$ method (Livak & Schmittgen, 2001). Expression levels were normalized by miR-U6, whose expression was constant among all samples.

Table 2. TaqMan® assays used for miRNA amplification by Real-Time PCR.

miRBase ID	miRBase accession No	Mature miRNA Sequence
rno-miR-1	MIMAT0003125	UGGAAUGUAAAGAAGUGUGUAU
rno-miR-23 ^a	MIMAT0000078	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC
rno-miR-128	MIMAT0000424	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU
rno-miR-133a	MIMAT0000839	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG
rno-miR-206	MIMAT0000879	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG

2.9 Statistical Analysis

Data were expressed as mean $\pm$ SD. Kolmogorov-Smirnov normality test was used to verify data normal distribution. Differences between C and I groups parameters were tested with unpaired Student's t test. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by a posteriori Tukey multiple comparison test was used to analyze CSA, mRNA and miRNA expression data. Statistical significance was considered achieved when the value of P was < 0.05 .

Results

Muscle atrophy and recovery

Soleus muscle mass reduced (27%) and decreased significantly the CSA in all muscle fibers types after 7 days of hindlimb immobilization in comparison with control group (Fig. 1). Regarding the soleus muscle fiber phenotype, seven days of the immobilization did not change the percentage of muscle fiber type compared to control group (data not shown).

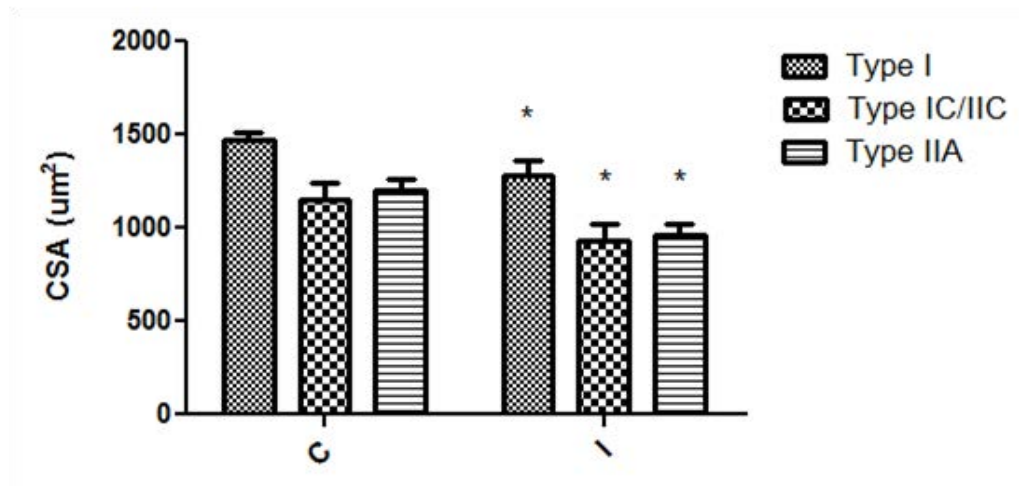


Figure 1. Cross sectional area (CSA) of soleus muscle after 7 days of immobilization period; C: Control group; I: Immobilization group. Values are expressed as the means $\pm$ SD (n= 8 rats per group). Significant difference compared to C group * ($p < 0.05$).

After 3 days of muscle recovery, none of the animals that had undergone to the atrophy process regained muscle mass (data not shown). After 7 days of muscle recovery, only animals that were submitted to aerobic exercise (AE7) regained the CSA in all muscle fiber types in the soleus muscle (Fig. 2). There were no changes in the frequency of the muscle fiber types in both muscles studied after 3 and 7 days of recovery (data not Shown).

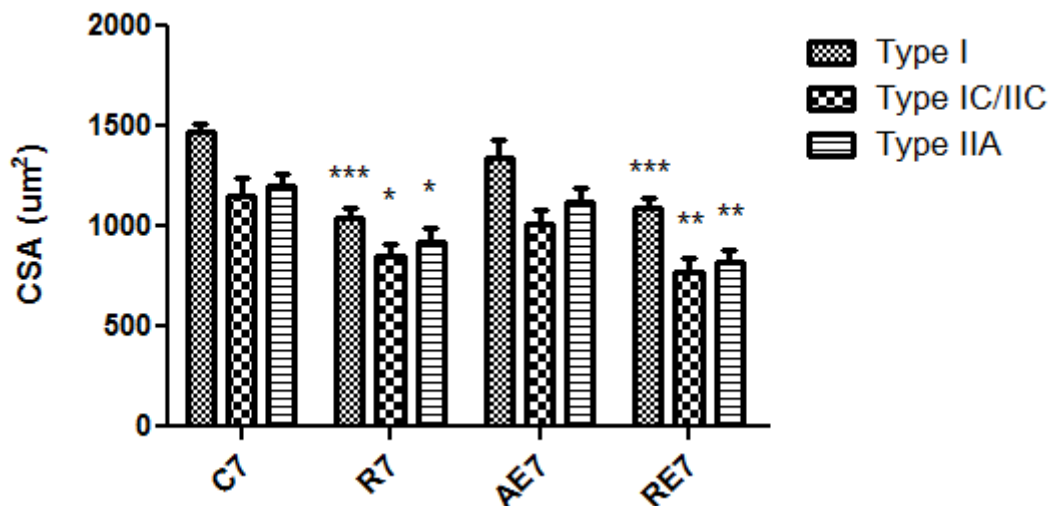


Figure 2. Cross sectional area (CSA) after the 7 days of soleus muscle recovery period; C: Control group; R7: Recovery without exercise group; AE7: Recovery with aerobic exercise group; RE7: Recovery with resistance exercise group. Values are expressed as the means $\pm$ SD (n= 8 rats per group). Significant difference compared to C group * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

Expression of muscle atrophy markers and Myogenic Regulatory Factors (MRFs)

To analyze the gene expression of key markers of muscle atrophy (MAFbx and MuRF1) and the MRFs in soleus muscle RT-qPCR was performed. Hindlimb immobilization increased

mRNA expression of MAFbx in the soleus muscle (2.5-fold) (Fig. 3). After 3 and 7 days of muscle recovery (with or without exercise) mRNA levels of these markers decreased and were similar to the control group in the soleus muscle (Fig. 4 and 5).

The mRNA expression of MRFs (MyoD and Myogenin) was not significant after 7 days of immobilization in soleus muscle (Fig. 3). After 3 days of muscle recovery we observed a significant increase in MyoD and Myogenin gene expression in the groups AE (+118% and +90%) and in RE (+247% and +60%), respectively (Fig. 4) in comparison to the control group; after 7 days of muscle recovery, only Myogenin gene expression was increased in R group (+40%), compared to the control group in soleus muscle (Fig. 5).

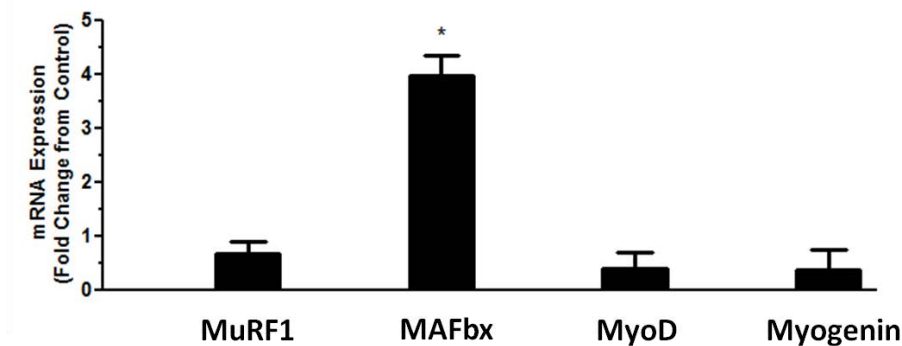


Figure 3. Relative mRNAs expression ($\log_2$ fold change from C group) of soleus muscle after 7 days of immobilization. Black bars represent the Immobilization group (n= 8 rats per group). Significant difference compared to C group * ($p < 0.05$).

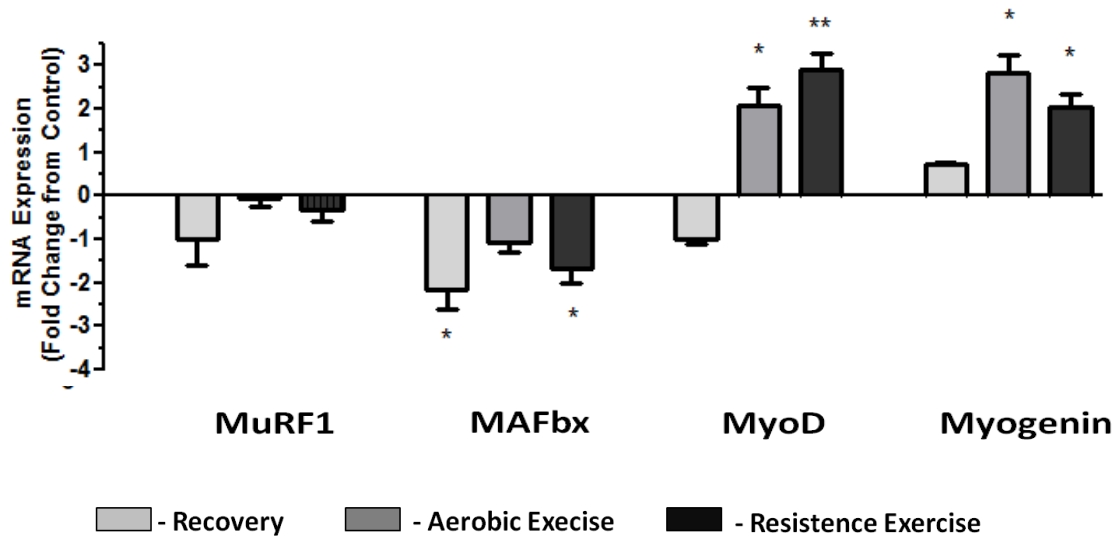


Figure 4. Relative mRNAs expression ($\log_2$ fold change from C group) of soleus muscle after 3 days of muscle recovery (n= 8 rats per group). Significant difference compared to C group * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$).

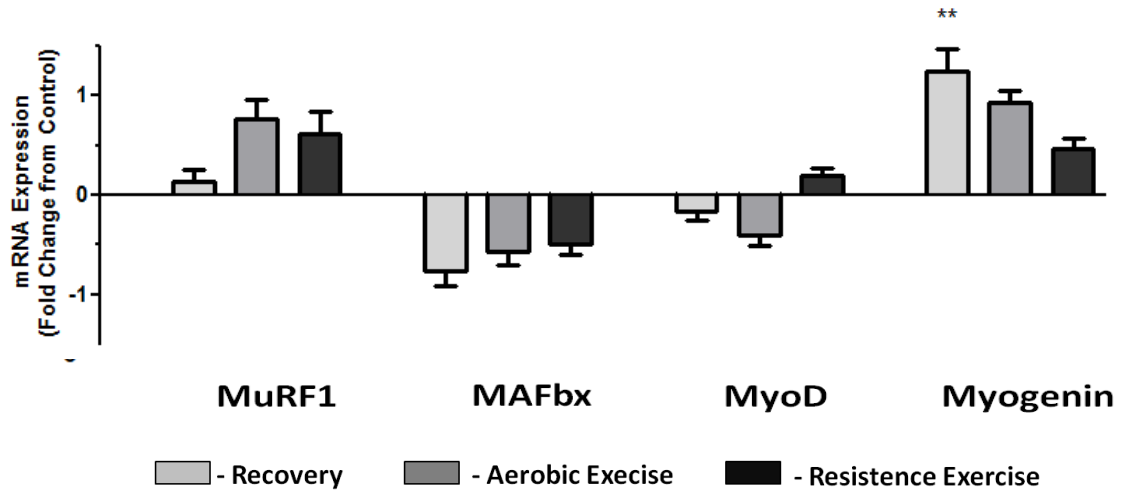


Figure 5. Relative mRNAs expression ($\log_2$ fold change from C group) of soleus muscle after 7 days of muscle recovery (n= 8 rats per group). Significant difference compared to C group * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$).

miRNA expression after atrophy and recovery

To establish the expression of myomiRs (miR-1, miR-133a and miR-206) and the miR-23a and miR-128 after soleus muscle atrophy and recovery, Taqman RT-qPCR was performed. After 7 days of immobilization, the levels of all miRNA studied significantly decreased: miR-1 (-42%); miR-23a (-56%); miR-128 (-39%); miR-133a (-38%) and miR-206 (-39%) in soleus muscle (Fig. 6).

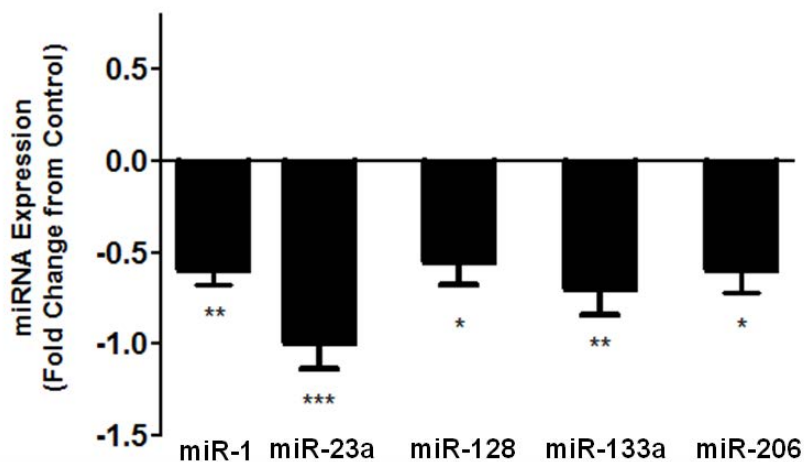


Figure 6. Relative miRNAs expression ($\log_2$ fold change from C group) of soleus muscle after 7 days of immobilization. Black bars represent the Immobilization group (n= 8 rats per group). Significant difference compared to C group * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

After 3 days of muscle recovery, in the AE3 and RE3 groups the level of miR-1 and miR-206 were similar to the control group in soleus muscle. In the R3 group, the levels of these miRNA were decreased yet compared to the control group: miR-1 (-75%) and miR-206 (-41%). The

expression levels of the miR-23a, miR-128a and miR-133a decreased in all groups compared to the control group in the soleus muscle. (Fig 7).

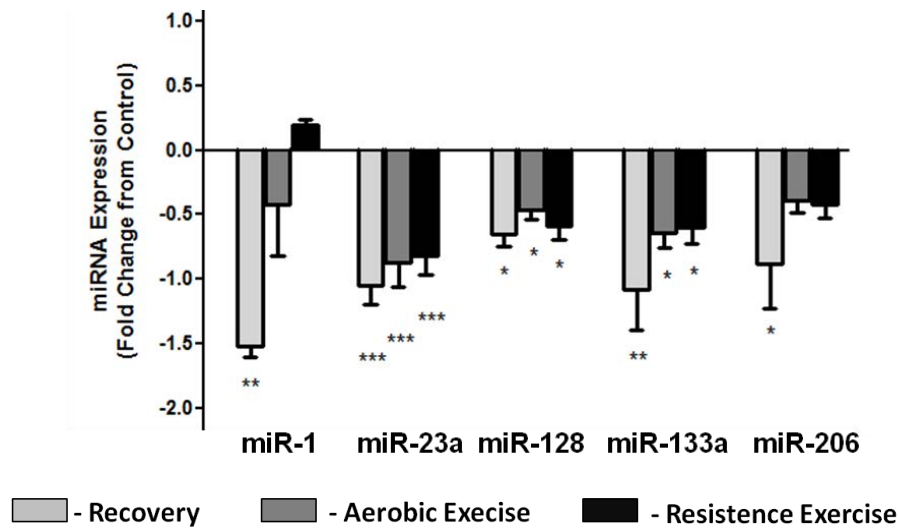


Figure 7. Relative miRNAs expression ($\log_2$ fold change from C group) of soleus muscle after 3 days of muscle recovery (n= 8 rats per group). Significant difference compared to C group * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

After 7 days of soleus muscle recovery all groups studied presented the expression levels of miR-1 and miR-206 similar to the control group and the expression levels of the miR23a and miR-133a remained decreased. However, the expression level of the miR-128 remained decreased only in the AE7 and RE7 groups (Fig. 8).

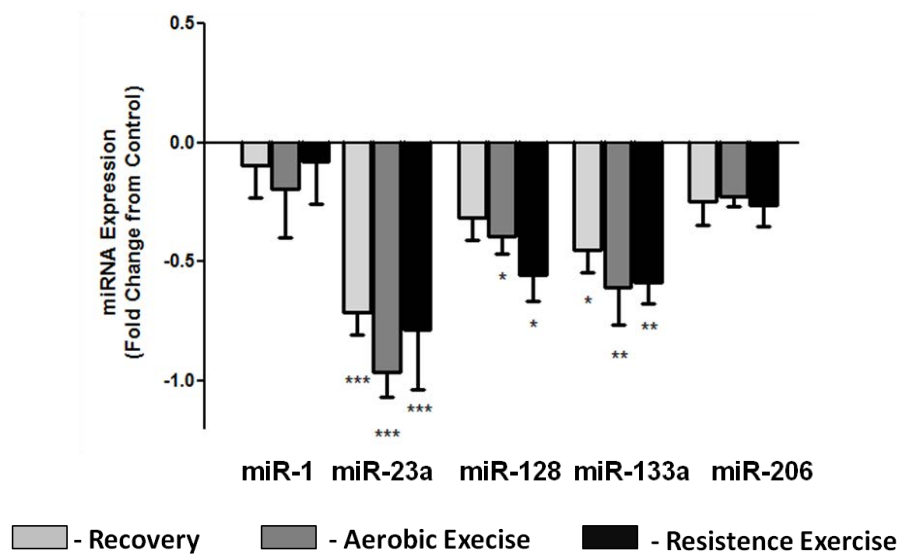


Figure 8. Relative miRNAs expression ($\log_2$ fold change from C group) of soleus muscle after 7 days of muscle recovery (n= 8 rats per group). Significant difference compared to C group * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

3. Discussion

The current study revealed that immobilization promoted soleus muscle atrophy and aerobic training accelerated the muscle recovery process. The expression of all miRNAs studied: miR-1, miR133a, miR-206, miR23a and miR-128 decreased in the soleus muscle submitted to atrophy process. After 3 days of soleus muscle recovery, the expression levels of the miR-1, miR-206 were similar to the control group in the animals submitted to both aerobic and resistance exercise programs. After 7 days of muscle recovery, rats without exercise showed the expression levels of the miR-1, miR-206 and miR-128 similar to control group in soleus muscle.

The miRNAs in skeletal muscle play a crucial role in regulating muscle development (McCarthy and Esser, 2007; Callis et al., 2008; Sharma et al., 2014). In addition, many studies have been conducted in order to understand their role in skeletal muscle diseases, aging and in response to exercise (Eisenberg et al., 2007; Drummond et al., 2008a; 2008b; Hamrick et al., 2010; Perbellini et al., 2011; Davidsen et al., 2011). However, few studies have been conducted about the behavior and performance of miRNAs during muscle regeneration (Nakasa et al., 2010; Yuasa et al., 2008).

The myomiRs (miR-1, miR-133a and miR-206) operate during muscle development and growth and in cell culture miR-133 promote myoblasts proliferation and miR-1 and miR-206 are involved with cell differentiation (Chen et al., 2006; Kim et al., 2006). MiR-206 is also upregulated in satellite cells following muscle injury and acts to promote satellite cell differentiation and fusion into muscle fibers through suppressing a collection of negative regulators of myogenesis (Liu et al., 2012).

After muscle atrophy, multiple miRNAs are deregulated. Eleven days of spaceflight resulted in a significant decrease in levels of the microRNA miR-206 in gastrocnemius muscle but miR-1 and miR-133a were not significantly affected (Allen et al., 2009). Kukreti et al. (2013) showed an increase of miR-1 levels in a dexamethasone-induced atrophy treatment in C2C12 myotubes; the inhibition of miR-1 attenuated the atrophy in C2C12 myotubes.

The MicroRNA expression profiling during muscle atrophy can change depending on the condition as fasting, denervation, streptozotocin-induced diabetes, and cancer cachexia (Soares et al. 2014). In our study, miR-1, miR-133a and miR-206 were decreased after 7 days of immobilization in the soleus muscle. To our knowledge our results are the first that showed changes in microRNAs levels in muscle atrophy in response to immobilization.

After 3 days of recovery of muscle atrophy, our data showed that the both exercise programs used accelerated the normalization of miR-1 and miR-206 levels while in animals

without exercise the normalization of miR-1 and miR-206 levels occurred after 7 days of muscle recovery.

MiR-1 and miR-206 regulate the transition of skeletal muscle satellite cells from proliferation to differentiation, inhibiting Pax7, a transcriptional factor expressed by satellite cells undifferentiated required for the initial activation of the MRF MyoD (Rosenberg et al., 2006). The increase of MyoD level will activate the expression of miR-1 and miR-206 that in turn control the Pax 7 expression stimulating the cell proliferation and differentiation process by the action of MyoD and Myogenin, respectively (Chen et al., 2006; Chen et al., 2010).

The expression of miR-1 and miR-133a increased after an acute exposure to endurance exercise but did not change the expression of miR-133b and miR-206 in human; after 12 weeks of training, the miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 were downregulated (Nielsen et al., 2010). A single bout of moderate-intensity endurance cycling exercise increased gene expression of several miRNAs including miR-1, -133a, 133b (Russell et al., 2013).

In our study, after 3 days of muscle recovery, the expression levels of MyoD and Myogenin increased only in the animals of both exercise program, and in animals without exercise, the expression levels of myogenin increased only after 7 days of muscle recovery. The increase in the MyoD and Myogenin gene expression and the normalization of miR-1 and miR-206 levels at 3 days demonstrate that aerobic and resistance exercise programs accelerated the muscle recovery, since these MRFs are involved with muscle cell proliferation and differentiation (Brack and Rando, 2012), process that is controlled by the miR-1 and miR-206 (Miano, 2003; Kim et al., 2006; Dey et al., 2011). However, at 7 days of muscle recovery, only aerobic exercise promoted a total CSA re growth in soleus muscle demonstrating that this kind of exercise is more prone to promote muscle mass recovery after muscle atrophy by immobilization. In the group without exercise, muscle recovery was delayed, as demonstrated by the gene expression of myogenin and the expression of miR-1 and miR-206. In addition, as the miR-133a level was low and did not change during the experiment period, we can infer that in our model of study, this miRNA could not be involved with muscle recovery in both exercise programs. Then, our findings suggest that miR-1 and miR-206 expression are sensitive to aerobic and resistance exercise after muscle atrophy by immobilization.

MiR-23a play a key role in protection against skeletal muscle atrophy regulating the muscle-specific ubiquitin ligases, Mafbx and MuRF1 (Wada et al., 2011). The levels of miR-23a have been showed decreased in different atrophy models. The Dex treatment promoted decrease of miR-23a in myotubes (Hudson et al., 2014) and 10 days of bed rest reduced the miR-23a in human vastus lateralis muscle (Rezen et al., 2014;). Wada et al. (2011) clearly showed that miR-23a

transgenic mice were resistant to dex-induced muscle atrophy, demonstrating that miR-23a is a novel regulator of muscle atrophy, playing a key role in protection against skeletal muscle atrophy.

In our study, soleus muscle atrophy induced by immobilization reduced the levels of miR-23a and increased the gene expression of MAFbx. These facts confirm that this miRNA is a strong negative regulator of these ubiquitin ligase and probably regulated soleus muscle atrophy in our experiment. After 3 and 7 days of muscle recovery with and without exercise the expression level of miR-23a remained reduced while the gene expression of MAFbx decrease after 3 days and was similar to the control group after 7 days of muscle recovery. These results showed that the aerobic and resistance exercises did not alter the expression of miR-23a after muscle atrophy and suggest that the control of MAFbx expression during muscle recovery is not dependent of miR-23a and could be regulated by others mechanisms.

Other miRNA that has been observed to play a role in the muscle plasticity is the miR-128, that has a potential to increase the skeletal muscle mass, acting as a negative regulator of the hypertrophy pathway IGF-1/AKT components (in review Hitachi and Tsuchida, 2014). Motohashi et al. (2013) showed that miR-128 regulate the target genes involved in insulin signaling and modulates myoblast proliferation and myotube hypertrophy. Overexpression of mir-128 in myoblasts inhibited cell proliferation by targeting insulin receptor substrate 1 (IRS1) and the inhibition of miR-128 induced myotube maturation in vitro and in vivo suggested that this miRNA can regulated the increase in muscle mass (Motohashi et al., 2013).

Our results showed that only in animals submitted to both exercise programs, the levels of miR-128 remained decreased after 7 days of muscle recovery in contrast to the group without exercise where the levels of miR-128 was similar to control group. Although we did not evaluate the miR-128 targets, our findings suggest that the exercise programs used for soleus muscle recovery after the immobilization was able to regulate the expression of this miRNA that possibly is related with the muscle re growth mass in soleus muscle, more evident in the group submitted to the aerobic exercise, as demonstrated by the CSA analysis.

In conclusion, the present experiment showed that aerobic exercise regulated the myomiRs miR-1 / -206 levels in the soleus muscle recovery after atrophy, accelerating the muscle cell differentiation through the MRFs.

4. Acknowledgments

This work was supported by FAPESP (Proc. 2011/08603-0).

5. References

- Allen DL, Bandstra ER, Harrison BC, Thorng S, Stodieck LS, Kostenuik PJ, Morony S, Lacey DL, Hammond TG, Leinwand LL, Argraves WS, Bateman TA, Barth JL (2009) Effects of spaceflight on murine skeletal muscle gene expression. **J Appl Physiol** 106:582–595.
- Appell HJ (1986) Skeletal muscle atrophy during immobilization. **Int. J. Sports Med.** 7: 1–5.
- Baar K, Nader N, Bodine S (2006). Resistance exercise, muscle loading/unloading and the control of muscle mass. **Bioch** 42: 61-74.
- Bartel, DP (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell** 136: 215–233.
- Brack AS; Rando TA (2012) Tissue-specific stem cells: lessons from the skeletal muscle satellite cell. **Cell Stem Cell** 10: 504–514.
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD (2001) Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nat Cell Biol** 3: 1014–1019.
- Bodine SC, Baehr LM, (2014) Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1 **Am J Physiol Endocrinol Metab** 307: E469–E484.
- Bustin S, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin. Chem.**55: 611–22.
- Callis TE, Deng Z, Chen JF, Wang DZ (2008). Muscling through the microRNA world. **Exp. Biol. Med.** 233: 131–138.
- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL & Wang DZ (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. **Nat Genet** 38: 228–233.
- Chen, J.-F., Tao, Y., Li, J., Deng, Z., Yan, Z., Xiao, X., et al. (2010). microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. **J. Cell Biol.** 190: 867–879.
- Collins C A, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, Morgan JE (2005). Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. **Cell** 122: 289-301.
- Cunha TS, Tanno AP, Costa Sampaio Moura MJ, Marcondes FK. (2005) Influence of high-intensity exercise training and anabolic androgenic steroid treatment on rat tissue glycogen content. **Life Sci.** 77: 1030–43.
- Da Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO, Cancelliero KM, Durigan JLQ. Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 2006;39:979–85.

- Davidson PK, Gallagher IJ, Hartman JW, Tarnopolsky MA, Dela F, Helge JW, et al. (2011). High responders to resistance exercise training demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNA expression. **J. Appl. Physiol.** 110: 309–317.
- Davis TA, Fiorotto ML. (2009) Regulation of muscle growth in neonates. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12: 78–85.
- Dey BK, Gagan J, Dutta A (2011). miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7. **Mol. Cell. Biol.** 31: 203–214.
- Drummond MJ, Dreyer HC, Pennings B, Fry CS, Dhanani S, Dillon EL, et al. (2008a). Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging. **J. Appl. Physiol.** 104: 1452–1461.
- Drummond MJ, McCarthy JJ, Fry CS, Esser KA, Rasmussen BB (2008b). Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 58: E1333–E1340.
- Eisenberg I, Eran A, Nishino I, Moggio M, Lamperti C, Amato AA, et al. (2007). Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 104: 17016–17021.
- Fleige S, Pfaffl MW. (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Mol. Aspects Med.** 27: 126–39.
- Foletta VC, White LJ, Larsen AE, Léger B, Russell AP (2011) The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. **Eur J Physiol** 461:325–335.
- Frimel TN, Kapadia F, Gaidosh GS, Li Y, Walter GA, Vandenborne K (2005) A model of muscle atrophy using cast immobilization in mice. **Muscle Nerve.** 32: 672–4.
- Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, et al. (2001) Atrogen-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proc Natl Acad Sci USA** 98: 14440-5.
- Hamrick MW, Herberg S, Arounleut P, He HZ, Shiver A, Qi RQ, et al. (2010). The adipokine leptin increases skeletal muscle mass and significantly alters skeletal muscle miRNA expression profile in aged mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 400: 379–383.
- Hitachi K, Tsuchida K. (2014) Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. **Front. Physiol.** 4: 408.
- Hudson MB, Woodworth-Hobbs ME, Zheng B, Rahnert JA, Blount MA, Gooch JL, Searles DC, Price SR (2014) miR-23a is decreased during muscle atrophy by a mechanism that includes calcineurin signaling and exosome-mediated export **Am J Physiol Cell Physiol** 306: C551–C558.
- Kraemer WJ, Adams K, Cafarelli E, Dudley GA, Dooly C, Feigenbaum MS, et al. (2002) American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Med. Sci. Sports Exerc.** 34: 364–80.

- Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, Malhotra A, Dutta A (2006). Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. **J. Cell Biol.** 174: 677–687.
- Kukreti H, Amuthavalli K, Harikumar A, Sathiyamoorthy S, Feng PZ, Anantharaj R, et al. (2013). Muscle-specific MicroRNA1 (miR1) targets heat shock protein 70 (HSP70) during Dexamethasone-mediated Atrophy. **J. Biol. Chem.** 288: 6663–6678.
- Liu N, Williams AH, Maxeiner JM, Bezprozvannaya S, Shelton JM, Richardson JA, et al. (2012). microRNA-206 promotes skeletal muscle regeneration and delays progression of Duchenne muscular dystrophy in mice. **J. Clin. Invest.** 122: 2054–2065.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) **Method. Methods** 25: 402-8.
- Louis E, Raue U, Yang Y, Jemiolo B, Trappe S. (2007) Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. **J Appl Physiol** 103: 1744–1751.
- Magaudda L, Mauro DD, Trimarchi F, Anastasi G (2004). Effects of physical exercises on skeletal muscle fiber: ultrastructural and molecular aspects. **Basic Appl Myol** 14(1): 17- 21.
- Matsakas A, Friedel A, Hertrampf T, Diel P (2005). Short-term endurance training results in a muscle-specific decrease of myostatin mRNA content in the rat. **Acta Physiol Scand** 183: 299–307
- Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. **J. Biophys. Biochem. Cytol.** 9: 493-495.
- Manchado DB, Gobatto CA, Voltarelli FA, Alice M, Mello R De. (2006) Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. **Appl Physiol Nutr Metab.** 31: 731–6.
- McCarthy JJ, Esser KA (2007). MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. **J. Appl. Physiol.** 102: 306–313.
- Miano JM (2003). Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 35: 577–593.
- Motohashi N, Alexander MS, Shimizu-Motohashi Y, Myers JA, Kawahara G, Kunkel LM (2013). Regulation of IRS1/Akt insulin signaling by microRNA-128a during myogenesis. **J. Cell Sci.** 126: 2678–2691.
- Nakasa T, Ishikawa M, Shi M, Shibuya H, Adachi N, Ochi M (2010). Acceleration of muscle regeneration by local injection of muscle-specific microRNAs in rat skeletal muscle injury model. **J. Cell. Mol. Med.** 14: 2495–2505.
- Nielsen S, Scheele C, Yfanti C, Akerstrom T, Nielsen AR, Pedersen BK, et al. (2010). Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. **J. Physiol.** 588: 4029–4037.
- Perbellini R, Greco S, Sarra-Ferraris G, Cardani R, Capogrossi MC, Meola G, et al. (2011). Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. **Neuromuscul. Disord.** 21: 81–88.

- Pette D, Staron RS (2000) Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microsc Res Tech** 50: 500-509.
- Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF (2006). Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 103: 8721–8726.
- Rezen T, Kovanda A, Eiken O, Mekjavic IB, Rogelj B (2014) Expression changes in human skeletal muscle miRNAs following 10 days of bed rest in young healthy males **Acta Physiol** 210: 655–666.
- Rosenberg MI, Georges SA, Asawachaicharn A, Analau E, Tapscott SJ. (2006) MyoD inhibits Fstl1 and Utrn expression by inducing transcription of miR-206. **J. Cell Biol.** 175: 77–85.
- Russell AP, Lamon S, Boon H, Wada S, Guller I, Brown EL, et al. (2013). Regulation of miRNAs in human skeletal muscle following acute endurance exercise and short term endurance training. **J. Physiol.** 591: 4637–4653.
- Schiaffino S, Reggiani C (1994) Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. **J Appl Physiol** 77(2): 493–501.
- Sharma M, Juvvuna PK, Kukreti H, McFarlane C (2014) Mega roles of microRNAs in regulation of skeletal muscle health and disease **Front Physiol.** 26 (5): 239.
- Soares RJ, Cagnin S, Chemello F, Silvestrin M, Musaro A, De Pitta G, Lanfranchi G, Sandri M (2014) Involvement of MicroRNAs in the Regulation of Muscle Wasting during Catabolic Conditions. **The Journal of Biological Chemistry**, 289 (32): 21909–21925.
- Soleimani, V.D., Punch, V. G., Kawabe, Y., Jones, A. E., Palidwor, G. A., Porter, C. J., et al. (2012). Transcriptional dominance of Pax7 in adult myogenesis is due to high-affinity recognition of homeodomain motifs. **Developmental Cell**, 22: 1208–1220.
- Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Fry a C, Murray JD, Campos GE. (1999) Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem.* **Cell Biol.** 111: 117–23.
- Sun Y, Ge Y, Drnevich J, Zhao Y, Band M, Chen J (2010). Mammalian target of rapamycin regulates miRNA-1 and follistatin in skeletal myogenesis. **J. Cell Biol.** 189: 1157–1169.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*; 3(7).
- Wada S, Kato Y, Okutsu M, Miyaki S, Suzuki K, Yan Z, et al. (2011). Translational suppression of atrophic regulators by microRNA-23a integrates resistance to skeletal muscle atrophy. **J. Biol. Chem.** 286: 38456–38465.
- Yuasa K, Hagiwara Y, Ando M, et al. (2008) MicroRNA-206 is highly expressed in newly formed muscle fibers: implications regarding potential for muscle regeneration and maturation in muscular dystrophy. **Cell Structure and fuction.** 33: 163–9.

