



**PERFIL GLOBAL DE EXPRESSÃO DE MICRO-RNAS NO
MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS COM INSUFICIÊNCIA
CARDÍACA**

LEONARDO NAZARIO DE MORAES

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PERFIL GLOBAL DE EXPRESSÃO DE MICRO-RNAS NO
MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS COM INSUFICIÊNCIA
CARDÍACA

LEONARDO NAZARIO DE MORAES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Área de concentração: Genética.

Orientador: Dr. Robson Francisco Carvalho

BOTUCATU – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Moraes, Leonardo Nazario de.

Perfil global de expressão de micro-RNAs no músculo esquelético de ratos com insuficiência cardíaca / Leonardo Nazario de Moraes. – Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Robson Francisco Carvalho

Capes: 20202008

1. Coração - Doenças. 2. Insuficiência cardíaca. 3. Rato como animal de laboratório. 4. Expressão gênica.

Palavras-chave: Expressão; Insuficiência cardíaca; Micro-RNA; Ratos.

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele nada seria possível. Grato pela dádiva da vida e por me guiar.

Agradeço ao meu orientador Professor Dr. Robson Francisco Carvalho, de fato um amigo, confiou na minha capacidade, deu todo apoio para execução desse trabalho, sempre presente, pronto a auxiliar, sempre incentivando. Um excelente orientador e amigo.

Agradeço imensamente aos meus pais Alfredo Martins Moraes e Glacimar Nazário de Barros que sempre estiveram comigo, dando-me todo apoio, carinho, educação e me ensinando o caminho que devo andar. Mesmo sob as diversas dificuldades sempre foram presente, amo muito vocês.

Meu grande amigo, um irmão, Ivan José Vechetti Júnior, que sempre esteve disposto a me ajudar, me apoiando em momentos e decisões difíceis. Além das incontáveis dicas que foram fundamentais para bom andamento desse projeto. Obrigado por ser presente na minha vida, pelas inúmeras vezes que me ajudou com os experimentos.

Minha amiga Mariana Antunes Ribeiro, companheira de conversas, obrigado por seus conselhos, amizade, momentos de risos e apoio. Você é uma pessoa muito especial pra mim.

Meu amigo Jason Javier Fernandez, obrigado por todo apoio, ajuda e discussões que foram tão úteis para execução deste trabalho. E também pelos momentos de descontração e risos.

Minha amiga Tassiana Gutierrez de Paula, companheira de corridas, quantas vezes discutimos sobre experimento e projetos de pesquisa ao irmos correr no Lageado. Muito obrigado pelo apoio amizade.

A minha amiga Raquel Santilone Bertaglia, obrigado por todo apoio e auxílio durante as coletas e execução de experimentos e por sua amizade que é tão valiosa.

Ao meu amigo João Paulo Queiroz Cardoso da Cunha, obrigado pelo companheirismo, amizade, auxílio no laboratório e momentos de descontração.

Agradeço meus amigos do Laboratório de Biologia do Músculo Esquelético (LBME):

Bruno, Cassiane, Edson, Fernanda Carani, Flávia, Henrique, Luana, Paula, Rondinelle, Rodrigo e Warlen pelo convívio agradável, compartilhamento de conhecimento e constante apoio. Em especial a professora Dra. Maeli Dal Pai por todo apoio e contribuições científicas que foram fundamentais para bom andamento desse trabalho.

Aos meus amigos de Mato Grosso, Ana Angélica, Cristina e Jhonattan que sempre me ajudaram e me incentivaram nessa jornada.

Aos professores Dr. Issakar Lima Souza e Dr. Paulo Cesar Venere, meus orientadores de graduação e amigos, sempre me deram todo apoio, sempre me ajudaram, acreditaram em mim, e, sem dúvida, foram base para eu estar aqui concluindo o mestrado.

Aos funcionários e professores do departamento de Morfologia-IBB-UNESP-Botucatu.

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

Agradeço à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de SP por financiar este trabalho e concessão de bolsa de mestrado (processo nº 2010/06281-3 e 2011/03004-1).

RESUMO

MicroRNAs (miRNAs) constituem uma classe de pequenos RNAs não codificadores de 17 a 25 nucleotídeos de comprimento envolvidos em uma grande variedade de processos celulares. Os microRNAs regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente, primariamente pela associação com a região 3' e/ou 5' não traduzida (3' UTR, 5' UTR) de seus RNAs mensageiros alvos geralmente reprimindo e, em alguns casos, estimulando a tradução. Atualmente, embora o número de genes relacionados com o desenvolvimento de doenças musculares aumente a cada ano, as vias moleculares envolvidas permanecem pobremente compreendidas. Porém, estudos recentes demonstram a importância da regulação mediada por microRNAs em diversos processos biológicos e em algumas doenças do músculo esquelético. A Insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica associada à disfunção cardíaca, diminuição da expectativa de vida e intolerância aos exercícios físicos. Essa intolerância aos exercícios físicos, bem como a redução da atividade locomotora, estão associados aos principais sintomas dos pacientes com IC: a fadiga e a fraqueza muscular. Esse fenômeno é decorrente, em parte, da mudança no metabolismo de oxidativo para glicolítico e da presença de atrofia e alterações nos tipos de fibras musculares. Nesse estudo, analisamos a expressão de 303 microRNAs no músculo sóleo da ratos *Wistar* macho com IC induzida por monocrotalina (60 mg/kg). O músculo sóleo dos animais com IC apresentaram uma alteração na expressão relativa de 19 microRNAs, com diminuição na expressão de 05 microRNAs ($< 50\%$; $P < 0,05$) e aumento na expressão de 14 microRNAs ($> 150\%$; $P < 0,05$) quando comparado com o grupo controle. Nossos dados mostram que os miRNAs miR-29b, miR-27a-5p, miR-434-3p, miR-539, miR-489, miR-214, miR-632 e miR-146b são regulados na miopatia esquelética que ocorre na insuficiência cardíaca, sugerindo que essas moléculas possam atuar como modulares desse processo. Em destaque temos os microRNAs miR-29, miR-214 e o miR-489 que fornecem valiosas informações sobre importantes vias de células musculares esqueléticas, como a NF- κ B-YY1-miR-29 e a regulação da proteína Ezh2 pelo miR-214, e o miR-489 atuando na manutenção da quiescência de células tronco musculares com repressão do oncogene *Dek*. Os demais microRNAs seguem sob análise de bioinformática para correlação com vias celulares importantes no músculo esquelético nessa condição.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are small (~17-25 nt) non-coding RNAs regulating mRNAs involved in various biological processes, including the pathophysiology of striated muscles. miRNAs suppress gene expression through their complementarity to the sequence of one or more mRNAs, usually at a site in the 3' untranslated region. The formation of an miRNA–target complex results either in inhibition of protein translation or in degradation of the mRNA transcript. There is no doubt that the formation, maintenance, and physiological and pathophysiological responses of skeletal muscles, with all their complex regulatory circuits, are subject to regulation by non-coding RNAs. Heart failure (HF) is characterized by a skeletal muscle myopathy with increased expression of fast myosin heavy chains (MyHCs) and atrophy. The skeletal muscle-specific molecular regulatory mechanisms controlling MyHC expression during HF have not been described and microRNAs may be related to these alterations. Using RT-qPCR TaqMan Low Density Arrays, we measured the expression of 303 microRNAs in soleus skeletal muscle from *Wistar* rat with monocrotaline (60 mg/kg)-induced HF. RNA isolated from soleus muscle of rat with HF showed increased expression of 14 microRNAs (> 150%; P<0,05) compared with controls. Similarly, HF-induced atrophy were accompanied by reduced expression of 05 microRNAs (< 50%; P<0,05). Interestingly, we outline the miRNAs miR-29, miR-214, and miR-489 that have been found to be dysregulated in diseases associated with skeletal muscle or are changed during muscle adaptation. These microRNAs are involved in important molecular pathways such as the NF-kB-YY1-miR-29 regulatory circuit, the miR-214 and Ezh2 regulatory loop, and the posttranscriptional suppression of oncogene *Dek* by the miRNA-489.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	iii
1. REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1. Insuficiência Cardíaca	1
1.2. Epidemiologia da Insuficiência Cardíaca	1
1.3. Fisiopatologia da Insuficiência Cardíaca	2
1.4. Resposta hipertrófica e a remodelagem ventricular	6
1.5. A insuficiência cardíaca além dos limites do coração: alterações do músculo esquelético	9
1.6. Aspectos Gerais do Músculo Estriado Esquelético	10
1.7. MicroRNAs e a Regulação da Expressão Gênica	18
1.8. MicroRNAs no Músculo Esquelético	22
1.9. MicroRNAs em Doenças do Músculo Esquelético	22
1.10. MicroRNAs e Alterações Musculares na Insuficiência Cardíaca	23
2. OBJETIVO	25
2.1. Objetivo Geral	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Animais e protocolo experimental	26
3.2. Estudo dos parâmetros anatômicos	26
3.3. Determinação da frequência dos tipos de fibras musculares	27
3.4. Análise das Cadeias Pesadas de Miosinas (MyHC)	27
3.5. Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR)	28
3.6. Western Blotting	32
3.7. Análise Estatística	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Indução de Insuficiência Cardíaca e Estudo dos Parâmetros Anatômicos	34
4.2. Atrofia e frequência das fibras musculares	35
4.3. Extração e análise da qualidade do RNA	38
4.4. Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR)	39
5. DISCUSSÃO	59
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	66
7. BIBLIOGRAFIA	67
8. MATERIAL SUPLEMENTAR	87

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Insuficiência Cardíaca

A Insuficiência Cardíaca (IC) é uma síndrome caracterizada por uma incapacidade do coração de preencher e/ou ejetar a quantidade de sangue adequada para as necessidades metabólicas do corpo; constitui uma condição patológica complexa e progressiva que envolve fatores ambientais e hereditários^{1,2}. Paralelamente a esta complexidade, o organismo dispõe de mecanismos compensatórios para atenuar o deficiente bombeamento de sangue: reação hemodinâmica de defesa que visa manter a pressão de perfusão de órgãos nobres e o débito cardíaco; resposta inflamatória onde o coração e outros órgãos parecem atuar como se estivessem agindo a um agentes estranhos; e resposta hipertrófica com remodelagem ventricular³. Tais mecanismos, inicialmente benéficos, manifestam-se como nocivos posteriormente contribuindo para a deterioração progressiva dos cardiomiócitos em sobrecarga³. Esta dualidade também é observada na terapêutica farmacológica da IC, pois muitos dos fármacos que melhoram os sintomas a curto prazo podem agravar o prognóstico a longo prazo e vice-versa³. A IC configura uma doença com incontestável impacto nas sociedades atuais pelas elevadas taxas de mortalidade e morbidade a que está associada³. Daí decorre a importância da compreensão da fisiopatologia desta síndrome a qual pode colaborar para o seu tratamento⁴.

1.2. Epidemiologia da Insuficiência Cardíaca

A prevalência da IC está entre 2 e 3 % da população ocidental e aumenta consideravelmente em pessoas de 70-80 anos de idade, perfazendo entre 10% e 20% da população^{1,5,6}. A incidência de IC acendeu mais de 150% nas duas últimas décadas e o número de pacientes com essa síndrome continua aumentando em função do desenvolvimento farmacológico, terapêutico e de técnicas e estratégias cirúrgicas que melhoram a sobrevivência após infarto agudo do miocárdio e outras condições cardiovasculares⁷. Grande parte dos esforços no estudo de doenças cardiovasculares está focada no ventrículo esquerdo, contudo essa perspectiva toma rumo adicional quando observamos que aproximadamente

30% dos casos de IC estão relacionados à falência do ventrículo direito (VD), e que a causa predominante de âmbito pós-transplante cardíaco é em função da insuficiência do VD ⁸. Na Europa, existem pelo menos 15 milhões de pacientes com IC e a prevalência de disfunção ventricular assintomática é semelhante, portanto, a IC ou disfunção ventricular assintomática está presente em aproximadamente 4% da população europeia ⁶. Os Estados Unidos possuem aproximadamente 5 milhões de pacientes com IC e mais de 550.000 novos casos são diagnosticados a cada ano ². Os dados epidemiológicos da síndrome no Brasil são semelhantes aos encontrados nos países desenvolvidos; conforme dados publicados pelo Ministério da Saúde, a IC encontra-se entre as principais causas de internação do Sistema Único de Saúde ⁹.

1.3. Fisiopatologia da Insuficiência Cardíaca

Diversos fatores podem desencadear lesões no coração e, consecutivamente, com o tempo levar a insuficiência cardíaca^{3,10}. Dentre esses fatores temos tabagismo, obesidade, diabetes, idade, sexo, sedentarismos, alcoolismo entre outros^{3,11}. Uma vez ocorrido o dano ao coração, o mesmo terá uma diminuição do débito cardíaco e isso resultará no desencadeamento de diversos mecanismos buscando restabelecer a perfusão tecidual comprometida¹². Primeiramente ocorre disfunção dos reflexos cardiovasculares, o que leva ativação adrenérgica exacerbada que apresenta, como consequência, uma vasoconstrição, com aumento na resistência periférica¹¹. Essa liberação exacerbada resulta na ativação de diversos mecanismos neuro-humorais que tentarão restabelecer o débito cardíaco comprometido¹³ (Figura 01). Os principais mecanismos são apresentados a seguir.

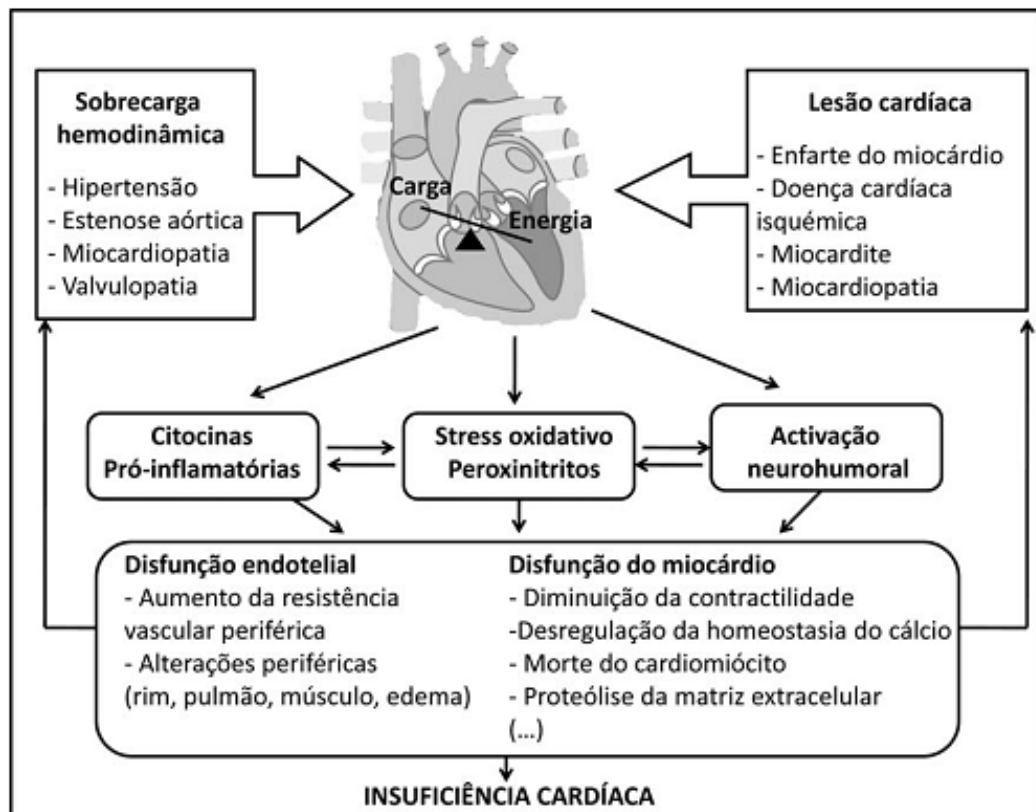


Figura 01: Visão geral integrada dos diferentes mediadores na fisiopatologia da insuficiência cardíaca (fonte: Seixas-Cambão, M, 2009)⁴.

a) Sistema Nervoso Simpático

Como efeito imediato, a ativação do sistema simpático, resulta no aumento da contratilidade miocárdica, da frequência cardíaca, e da resistência periférica, visando melhorar o débito cardíaco e redistribuir melhor o fluxo sanguíneo¹⁴. A princípio, essa ação é benéfica, contudo, apresenta elevado custo, com aumento do gasto energético das fibras cardíacas e aumento da pós-carga, sobrecarregando ainda mais o ventrículo já comprometido^{14,15}. Consequência dessa sobrecarga, ocorre a hipertrofia das fibras miocárdicas e isquemia (aumento do gasto de energia), o que favorece o aparecimento de arritmias, piorando ainda mais o estado do coração¹⁶. Com o decorrer do tempo, há uma diminuição no número e na sensibilidade dos receptores β_1 -adrenérgicos do miocárdio¹⁷, levando a uma resposta contrátil menor, além de induzir a produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e as interleucinas-1 (IL-1) e a

interleucina-6 (IL-6), as quais contribuem para decréscimo maior da contração do coração, aumentando as câmeras ventricular e piora da IC^{14,18}.

b) Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

A diminuição do débito cardíaco resulta na liberação aumentada de renina pelo aparelho justaglomerular, ele age sobre o substrato de angiotensinogênio, levando à produção de uma substância inerte sob o ponto de vista da vasoação, a angiotensina I¹⁹. Esse peptídeo é processado pela enzima conversora de angiotensina (ECA), transformando-se em angiotensina II, que é um potente vasoconstritor^{19,20}. A angiotensina II também é produzida no coração, pulmões e endotélio vascular, levando a vaso constrição, redistribuindo o fluxo sanguíneo, contudo aumentando muito a resistência periférica, o que dificulta mais a ação do ventrículo esquerdo²⁰. Paralelamente, a angiotensina II estimula a produção de aldosterona pela supra-renal, levando a retenção de sódio e água, elevando a volemia e intensificando o retorno venoso (pré-carga)²¹. Esse volemia leva aumento do volume ventricular, tendendo a aumentar o volume sistólico pelo maior estiramento da fibra miocárdica²¹. Contudo, esse mecanismo de ação só será efetivo até que se atinja o limite de dilatação ventricular, após esse momento, esse estiramento não se refletirá em aumento da contração²¹. A expansão progressiva do ventrículo transformará a câmara ventricular em uma esfera, perdendo a configuração elipsoide normal, esse processo é chamado de remodelamento²². A angiotensina II também leva hipertrofia da fibra miocárdica, apoptose, fibrose intersticial²³. A androsterona também leva à proliferação de fibroblastos e à deposição de colágeno, além de reduzir a reutilização neuronal de epinefrina²⁴. Assim sendo, o sistema renina-angiotensina-aldosterona vai agravar mais ainda a IC instalada²⁵.

c) Endotelina

Entre diversas outras substâncias, o endotélio, produz endotelina, um peptídeo de 21 aminoácidos que tem ação vasoconstritora²⁶. Sua produção é estimulada pela angiotensina II, pela norepinefrina, pela IL-1 e pelo sistema arginina-vasopressina²⁶. Sua ação mitogênica estimula o crescimento vascular, colaborando para o remodelamento cardíaco, além de aumentar a ativação de fibroblastos²². A endotelina plasmática está diretamente correlacionada à pressão arterial pulmonar e à resistência vascular pulmonar⁴. Na IC, sua contração está aumentada e essa elevação é um dos preditores de mau prognóstico²².

d) Arginina-vasopressina

Elevadas concentrações de norepinefrina e angiotensina II estimula a hipófise a produzir e secretar arginina-vasopressina²⁷, um neuro-hormônio que induz vasoconstrição, retenção de sódio e hiponatremia dilucional²⁸. Na IC, os níveis de arginina-vasopressina estão muito elevados, particularmente nos pacientes sintomáticos e nos casos secundários, a infarto do miocárdio com grande destruição muscular²⁹.

e) Citocinas pró-inflamatórias

Na IC há aumento da expressão das citocinas pró-inflamatórias, como as do fator de necrose tumoral α (TNF- α), da interleucina 1 (IL-1), da interleucina 6 (IL-6) e do CD14 solúvel¹⁸ e também a ativação de fatores do complemento, como o C5b-9, que também tem sido implicado na fisiopatologia da IC³⁰. A ativação imune na IC inclui dois mecanismos: estimulação antigênica direta, como ocorre na miocardite aguda e na reação ao transplante cardíaco; e a estimulação secundária à lesão cardíaca que expõe “novos antígenos” capazes de despertar uma resposta imunológica contra o coração, como a que ocorre após um enfarte agudo do miocárdio³¹.

As citocinas pró-inflamatórias afetam negativamente a função ventricular, induzem alterações no metabolismo cardíaco e promovem a remodelagem ventricular³². Isso resulta em hipertrofia dos cardiomiócitos, necrose, apoptose e alterações na matriz extracelular do miocárdio, além de contribuem para a caquexia, frequente em indivíduos com IC avançada, e para a miopatia dos músculos esqueléticos¹⁸.

f) Peptídeos Natriuréticos

O átrio produz quatro peptídeos natriuréticos (com ação diuréticas e natriuréticas) – tipo A (ANP), tipo B (BNP), tipo C (CNP) e tipo D (DNP)³³. Os níveis plasmáticos desses peptídeos encontram-se elevados na IC, devido em parte, à sobrecarga hemodinâmica que estimula a expressão dos genes que os codificam³⁴. Os peptídeos natriuréticos atuam pela ativação de três tipos de receptores: tipo A (liga-se ao ANP e BNP), tipo B (liga-se preferencialmente ao CNP) e tipo C³³. Desempenham um papel primordial como agentes “contrarreguladores” da IC em virtude dos seus efeitos diurético, natriurético e vasodilatador³⁵. Manifestam também um efeito inibitório sobre o sistema nervoso simpático,

contribuindo para a diminuição dos níveis de adrenalina na IC³⁶. A nível do sistema cardiovascular, o ANP e o BNP revelam ainda uma atividade antimitogênica, intervindo assim na modulação do crescimento vascular³⁴.

1.4. Resposta hipertrófica e a remodelagem ventricular

O estresse biomecânico e os mediadores extracelulares resultantes da resposta neuro-humoral em ação conjunta com fatores de crescimento e moléculas de adesão celular, levam a hipertrofia ventricular³⁷. Esta resposta, inicialmente com carácter puramente adaptativa, representa uma tentativa do organismo de compensar a sobrecarga de pressão e/ou volume, no entanto, isso, mais tarde, contribuirá para a progressão e agravamento da IC³⁷. O estresse biomecânico é transmitido por meio da membrana citoplasmática dos cardiomiócitos por mecanismos ainda não plenamente elucidado³⁷. Possivelmente, os canais iônicos sensíveis ao estiramento, as integrinas e outras proteínas estruturais atuam nesse processo e, em conjunto, estabelecem uma ligação entre a matriz extracelular, o citoesqueleto, o sarcômero, as proteínas envolvidas na homeostasia do cálcio e o núcleo³⁷.

Nos cardiomiócitos, o estresse biomecânico, bem como a hipertensão crônica e a sobrecarga de pressão, ativa múltiplos sinais simultaneamente e convergentes que provocam hipertrofia e apoptose¹⁶. Também é induzido a síntese e secreção de potentes fatores de crescimento, como a endotelina 1, o fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-1) e a angiotensina II (Ang II)¹⁶. O estiramento mecânico tem a capacidade de ativar diretamente os receptores de Ang II nos cardiomiócitos, sem a presença de Ang II¹⁶. Simultaneamente, o estresse biomecânico também leva à indução dos ligantes dependentes da gp130, como a cardiotropina 1³⁸. Esta citocina, da família da interleucina-6, liga-se ao seu receptor, que consiste no heterodímero gp130-LIF (do inglês, *leukemia inhibitory factor*), condicionando a ativação de vias que bloqueiam a apoptose³⁸. Na ausência da gp130, a resposta dos cardiomiócitos ao estresse biomecânico é direcionada para a apoptose, com perda de cardiomiócitos funcionais e início da IC³⁸.

Ao nível celular, o estresse biomecânico exercido sobre os cardiomiócitos inicia diferentes processos que conduzem a padrões distintos de hipertrofia³⁸. No coração com sobrecarga de pressão, as novas unidades de proteínas contráteis são adicionadas em paralelo, resultando num aumento relativo da largura dos cardiomiócitos individualmente e, portanto, na hipertrofia concêntrica, com redução do volume da cavidade do ventrículo³⁸. Em doentes

com sobrecarga de volume, a adição em série de novas unidades de proteínas contráteis caracteriza a hipertrofia excêntrica, com um aumento proporcionalmente maior no comprimento do que na largura dos cardiomiócitos³⁸.

A hipertrofia desenvolve-se, assim, a partir de alguns mecanismos indutores: o aumento dos níveis de cálcio intracelular (um dos eventos iniciais neste processo³⁹, a ativação celular induzida por fatores como o TGF- β (do inglês, *transforming growth factor beta*), a ET-1, as catecolaminas e a Ang II⁴⁰. Destacam-se alguns dos fenômenos precoces e tardios da Ang II, através da ativação de receptores AT-1, implicados no processo de hipertrofia cardíaca⁴¹. Assim, a Ang II ativa, precocemente, três membros da família das quinases de proteínas ativadas por mitogênicos (MAPK), ERKs, JNK e p38⁴¹. As vias de sinalização dependentes das MAPK aumentam a expressão de vários proto-oncogenes de resposta rápida como c-fos, c-myc e c-jun e estão envolvidos na proliferação, diferenciação e transformação celular, bem como na apoptose, daí a sua participação na fisiopatologia da IC⁴². A longo prazo, a Ang II influencia as adaptações crônicas envolvidas na remodelagem vascular, pela ativação sustentada das quinases que fosforilam alvos implicados, por exemplo, na produção de fatores de crescimento e radicais livres de oxigênio⁴³. A Ang II também desempenha um papel importante na ativação da isoforma do TGF- β predominante no sistema cardiovascular (TGF- β 1)⁴⁴. Foi demonstrado o papel crucial da ativação da cascata de sinalização do fator nuclear NF- κ B, envolvido no crescimento celular, fibrose ou apoptose, dependendo do contexto envolvente na iniciação da hipertrofia cardíaca e posterior progressão para IC^{45,46}. Uma das vias de sinalização intracelular estimulada pelos receptores AT-1 e AT-2 é a via do fator NF- κ B⁴⁶.

A autofagia cardíaca é um processo que também contribui para a transição da hipertrofia cardíaca para a IC⁴⁷. A autofagia, um mecanismo celular de reciclagem de proteínas e organelas, encontra-se ativada nos cardiomiócitos insuficientes, como resposta ao estresse biomecânico^{47,48}. A beclina-1, uma proteína necessária para a formação do autofagossomo, desempenha um papel primordial nesse processo. Demonstrou-se que a inibição da expressão gênica de um dos alelos que codificam a beclina-1 diminui a autofagia dos cardiomiócitos e a remodelagem induzida pelo estresse biomecânico⁴⁸. A remodelagem ventricular diz respeito a um processo progressivo de dilatação, hipertrofia, perda de cardiomiócitos, aumento da fibrose intersticial e disfunção ventricular¹⁶, presente na IC. O coração sofre remodelagem como resposta a uma variedade de estímulos, fato que ilustra a sua plasticidade⁴⁸. O exercício físico, a gravidez e o crescimento pós-natal promovem o

crescimento fisiológico do coração, enquanto que a hipertensão e a lesão miocárdica, por exemplo, podem condicionar uma hipertrofia patológica⁴⁹. Esta última, contrariamente ao crescimento fisiológico, pode aumentar o risco de IC e arritmias malignas⁴⁹.

A remodelagem ventricular numa perspectiva global, a nível microscópico e macroscópico, é dividida em seus diferentes componentes: 1) alterações na biologia do miócito (nomeadamente: expressão dos genes fetais das cadeias pesadas da miosina, perda de miofilamentos, hipertrofia; miocitólise e dessensibilização adrenérgica); 2) alterações estruturais miocárdicas a nível celular (perda de cardiomiócitos por necrose e apoptose e alterações na matriz extracelular); e 3) alterações na geometria da câmara ventricular esquerda (dilatação e adelgaçamento da parede do ventrículo esquerdo, aumento da esfericidade, fibrose subendocárdica e insuficiência mitral)⁵⁰. Para que se verifique remodelagem ventricular é necessário que ocorra o estiramento e alongamento dos cardiomiócitos, bem como o deslizamento de uns sobre os outros⁵⁰. A articulação de fatores mecânicos, humorais e autócrinos estimula os fibroblastos a expressarem vários tipos de mRNAs (de colágeno, fibronectina, entre outros) que no seu conjunto conduzem à fibrose – elemento que acompanha a remodelagem ventricular⁵⁰.

A fibrose cardíaca está associada à alteração da estrutura normal do coração ao nível dos cardiomiócitos e a uma deposição excessiva das proteínas da matriz extracelular⁴⁴. Foi demonstrado que através da constrição aórtica em ratos, que a via do TGF- β 1 ativa uma transição endotelial-mesenquimatosa, a qual, por sua vez, aciona a fibrose cardíaca⁵¹. O TGF- β 1 promove essa transição pela ativação das moléculas Smad2 e Smad3⁵¹. Um outro membro da família do TGF, a *bone morphogenic protein7* (BMP-7), um antagonista da via do TGF- β , inibe essa transição, com uma ação protetora contra a fibrose⁵¹. Isso mostra a interligação entre hipertrofia e fibrose e revela uma molécula que pode prevenir ou reverter a fibrose cardíaca⁵¹. Paralelamente, de Ca^{2+} e diminuição da libertação de Ca^{2+} a partir do retículo sarcoplasmático^{52,53}. A expressão de SERCA2a, ao diminuir a concentração citossólica de Ca^{2+} , parece prevenir a ativação de moléculas sinalizadoras como a calcineurina⁵³.

Na IC há, efetivamente, uma perturbação da homeostasia de diferentes elementos celulares¹⁶. Ao nível dos sarcômeros, ocorre uma diminuição da atividade específica da ATPase da miosina, um aumento da expressão de cadeias fetais da miosina, bem como o aparecimento de cadeias pesadas da miosina $\beta\beta$ ¹⁶. A expressão de proteínas da membrana citoplasmática pode estar igualmente alterada, observando-se o aumento dos canais de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e a diminuição dos receptores β 1-adrenérgicos e muscarínicos⁴⁰.

1.5. A insuficiência cardíaca além dos limites do coração: alterações do músculo esquelético

A IC é uma síndrome clínica na qual os pacientes apresentam as seguintes características: nítidas evidências de alterações na estrutura ou função do coração ao repouso; sinais de retenção fluídica tais como congestão pulmonar ou inchaço dos tornozelos; e os sintomas típicos de IC, dispnéia ao repouso ou em mínimos esforços, cansaço e fadiga^{6,54-56}. Embora vários fatores tenham sido descritos como responsáveis pelo desenvolvimento da fadiga, a sua etiopatogenia ainda não está completamente esclarecida. Esse fenômeno é decorrente, em parte, da presença de alterações nos tipos de fibras musculares⁵⁷⁻⁶¹ e da mudança no metabolismo de oxidativo para glicolítico⁶². Dados de nosso laboratório demonstraram que essas alterações musculares na IC são acompanhadas pelo aumento ou diminuição da expressão de fatores transcricionais músculo-específicos e de enzimas relacionadas com alterações na matriz extracelular⁶³⁻⁶⁵.

Outro fator responsabilizado pelo desenvolvimento de fadiga na IC é a presença de atrofia da musculatura esquelética, observada em diferentes modelos animais^{60-63,66,67} e em pacientes com essa síndrome^{59,68-71}. A perda de massa muscular por caquexia é uma séria complicação da IC, a qual pode afetar 10-15% dos pacientes com IC crônica durante o curso natural da doença⁶; os pacientes com caquexia cardíaca desenvolvem uma importante incapacidade locomotora e possuem um pobre prognóstico⁷². É um processo generalizado que engloba todos os compartimentos corporais, tais como massa magra (músculo esquelético), massa gorda (reserva energética) e tecido ósseo (osteoporose)⁷³. A caquexia pode ser definida como perda de peso involuntária não edematosa de 6% do peso corpóreo total em um período de 6-12 meses⁷⁴. A patofisiologia da caquexia na síndrome da IC permanece pouco esclarecida; pobre nutrição, má absorção, comprometimento do balanço calórico e proteico, resistência hormonal, ativação imune pró-inflamatória, alterações neuro-hormonais e esgotamento das forças anabólicas podem estar associadas⁷³.

Os determinantes patofisiológicos da caquexia são vários e alguns são comuns para outras doenças crônicas severas. Entretanto, ocorre uma sensibilização cada vez maior de que a miopatia do músculo esquelético na IC contribui sobremaneira com as condições debilitantes da síndrome e é considerada uma entidade distinta, caracterizada por mudanças morfológicas, estruturais e funcionais, além de possuir o envolvimento de várias vias neuro-

hormonais, processos catabólicos, um ambiente pró-inflamatório e aumento do estresse oxidativo (para revisão ver Conraads *et al.*, 2008⁷²). Embora avanços na identificação de genes e vias moleculares que controlam as alterações do músculo esquelético na IC já tenham sido descritos, a complexidade dos processos sugere o envolvimento de mecanismos reguladores globais adicionais na modulação das vias de sinalização celular. Recentes estudos indicam que moléculas de RNA reguladoras codificadas pelo genoma, tais como os micro-RNAs, podem regular a função do músculo esquelético durante o desenvolvimento e em várias doenças musculares⁷⁵.

1.6. Aspectos Gerais do Músculo Estriado Esquelético

Cerca de metade da massa do corpo humano é composto por músculo esquelético, e para além do seu papel na atividade locomotora e postural, o músculo esquelético também atua como um regulador do metabolismo, como por exemplo, armazenando glicogênio⁷⁶. O músculo estriado esquelético é um tecido complexo, heterogêneo, dinâmico que possui características particulares de adaptação morfológica, metabólica e funcional frente aos mais variados estímulos⁷⁷. Sua principal função é gerar força e movimento, para tanto, é exigido a participação coordenada de inúmeras vias fisiológicas e componentes associados⁷⁸. A diferenciação, maturação e desenvolvimento do tecido muscular são mediadas por um grupo de fatores transcricionais nomeados de Fatores de Regulação Miogênicos (do inglês, *myogenic regulatory factors* - MRFs), que inclui a MyoD, Myf5, MRF-4 e miogenina⁷⁹. Esses, quando ativados, se ligam a regiões específicas do DNA estimulando a transcrição de genes que são fundamentais para o fenótipo do músculo, pois leva a síntese de proteínas como, as miosinas e troponina^{79,80}. Além disso, Esses fatores transcricionais regulam a diversidade, plasticidade e especialização do músculo esquelético^{79,80}.

Na formação embrionária do músculo esquelético os fatores transcricionais MyoD, Myf5 e Pax7 são fundamentais para que populações de células mesodermis se comprometam e diferenciem em mioblastos, esses, por ação da miogenina e MRF-4, se transformam em miócitos, células mononucleadas que, subsequente, se fundem para formar a fibra muscular multinucleada; esse processo acontece similarmente no músculo adulto no processo de regeneração⁸⁰. Nesse mesmo processo, uma parcela da população de mioblastos indiferenciados se mantém quiescentes em forma de células satélites nos espaços entre as fibras musculares^{80,81}. Essas células são recrutadas, quando necessário, para crescimento e

regeneração muscular, podendo gerar novas fibras ou mesmo fundir-se a fibras existentes^{80,81}. Estímulos constantes como exercício físico e regeneração são mecanismos que permite a ativação de células satélites, levando-as a diferenciação e participação na formação de novas fibras⁸¹. Esse recrutamento de células satélites é fundamental para manutenção e adaptação das estruturas musculares frente às demandas funcionais, embora já tenha sido mostrado que a regeneração muscular também pode ocorrer na ausência de células satélites⁸¹.

As fibras musculares, que são alongadas e multinucleadas com seus núcleos periféricos, estão imersas em uma matriz extracelular rica em carboidratos e proteínas, que constituem o tecido conjuntivo do músculo⁸². Esse tecido está organizado em três bainhas distintas: o epimísio, que circunda todo o músculo; o perimísio, que divide o músculo em fascículos e o endomísio, que circunda cada fibra muscular⁸². Essas bainhas, além do papel de contenção das fibras musculares, limita a expansão do músculo (em virtude da disposição em camadas concêntricas de tecido colágeno) e também são elementos fundamentais para a transmissão da força muscular⁸³ (Figura 02).

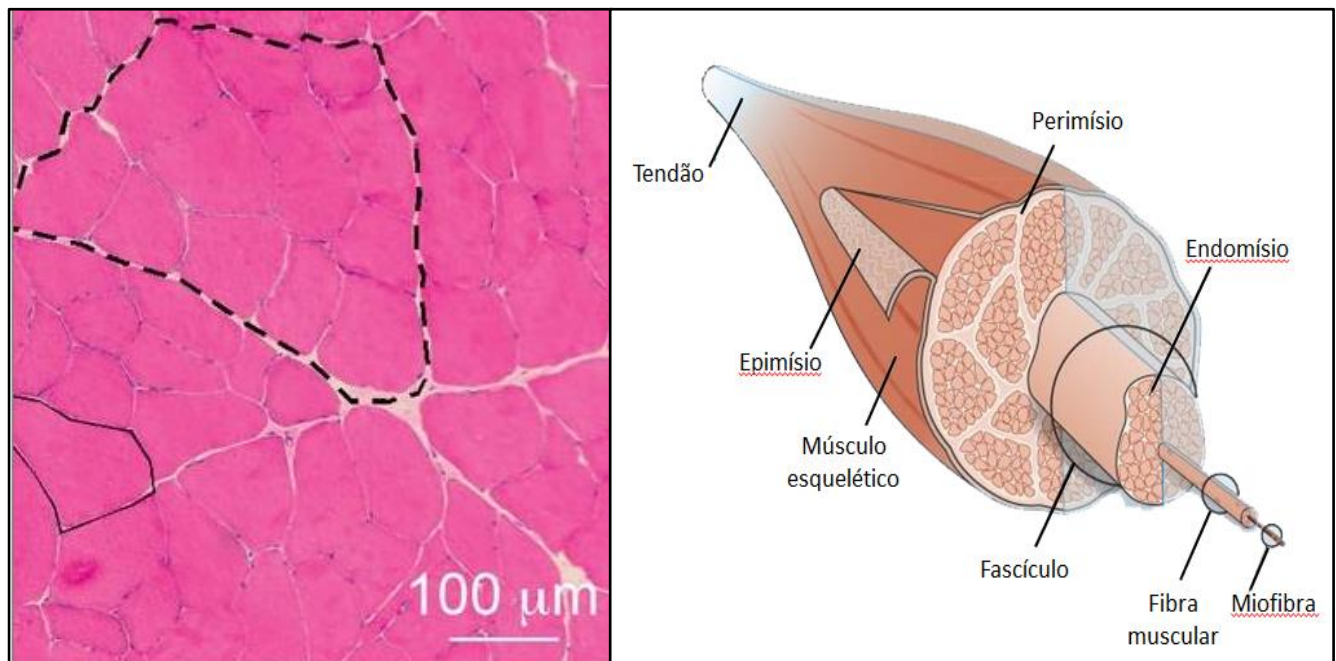


Figura 02: Cortes transversal (esquerda) do músculo esquelético submetido a coloração HE (Hematoxilina-Eosina), linha tracejada evidenciando o perimísio, linha contínua o endomísio. (Adaptado de Gillies, AR and Lieber, RL, 2011)⁸⁴

As fibras musculares são envolvidas pela membrana plasmática denominada sarcolema, que é fundamental para condução de onda de despolarização pela fibra e no processo de propagação do estímulo de contração na fibra muscular⁸⁵. No interior das fibras musculares temos o sarcoplasma, onde se localizam as organelas especializadas, entre elas o retículo sarcoplasmático que é constituído por uma rede de canais tubulares que permitem a propagação da onda de despolarização por toda a fibra, regulando o fluxo de cálcio, fundamental para contração muscular⁸⁵. As fibras musculares são basicamente formadas pelos sarcômeros, unidades iguais e repetidas que são delimitadas pela linha Z, dentro dos quais se localizam os filamentos proteicos finos e grosso, denominados complexo proteico do sarcômero^{85,86}. Os filamentos finos são formados por actina, tropomiosina, troponina e tropomodulina. A actina é formada por um polímero longo de actina F, e por duas cadeias de monômeros globulares (actina G) torcidas uma sobre a outra⁸⁷. A tropomiosina é uma molécula longa e fina, formada por duas cadeias polipeptídicas em forma de dupla hélice localizada no longo do sulco entre os filamentos de actina F⁸⁷. Existem duas isoformas, a tropomiosina α com variação rápida e lenta, e a tropomiosina β ⁸⁷. A troponina é um complexo proteico formado por três subunidades no músculo esquelético com funções específicas, são elas: troponina C (TnnC), é a subunidade em que o cálcio se liga, sendo essencial para a ligação com a miosina, possui duas isoformas TnnC rápida, com quatro ligações para o cálcio, a TnnC lenta, com uma ligação para o cálcio; troponina I (TnnI) que inibe a ação da actina e a atividade da ATPase, no músculo esquelético temos duas isoformas a TnnI1 (lenta) e TnnI2 (rápida), essas isoformas estão relacionadas com a velocidade de contração; e a troponina T (TnnT) que também tem isoformas lenta e rápida⁸⁷. Além dessas proteínas, temos a tropomodulina que mantém os filamentos de actina em seu comprimento, e também as proteínas C, H e M que se ligam ao filamento grosso contribuindo para permanência da integridade do sarcômero⁸⁷ (Figura 03).

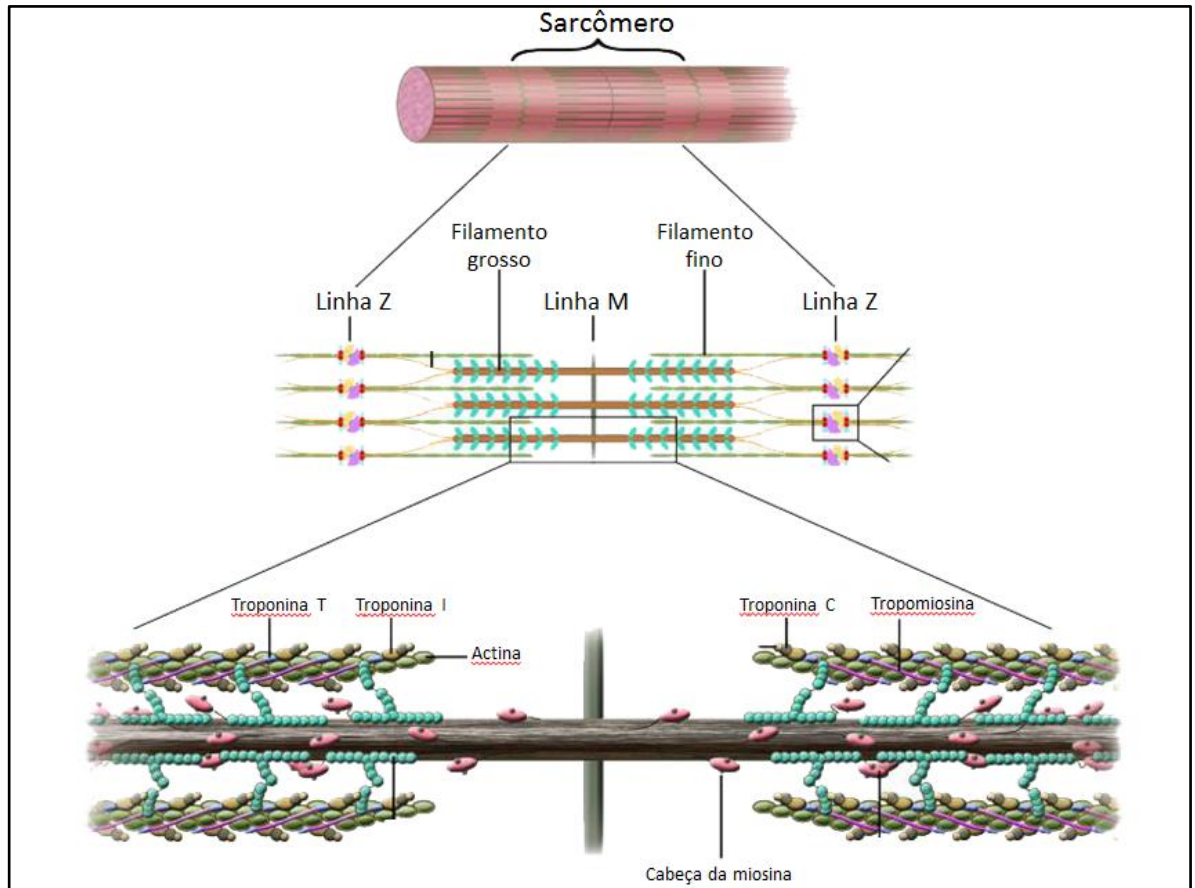


Figura 03: Organização geral do sarcômero.

(Adaptado de Morita, H., Seidman, J. and Seidman, C.E., 2005)⁸⁸

A proteína mais abundante e fundamental para contração é a miosina, um hexâmero formado por seis polipeptídeos: duas cadeias pesadas (do inglês, *myosin heavy chain*, MyHC), enroladas em α -hélice e quatro cadeias leves (do inglês, *myosin light chain*, MLC)⁸⁹⁻⁹¹. Cada MyHC pode ser separada em duas porções: meromiosina leve (do inglês, *light meromyosin*, LMM), em forma de bastão, e meromiosina pesada (do inglês, *heavy meromyosin*, HMM), conhecida como porção globular da miosina, que contém um sítio de interação com a actina e uma região de ligação com a molécula de ATP (com atividade ATPase)^{86,89} (Figura 04).

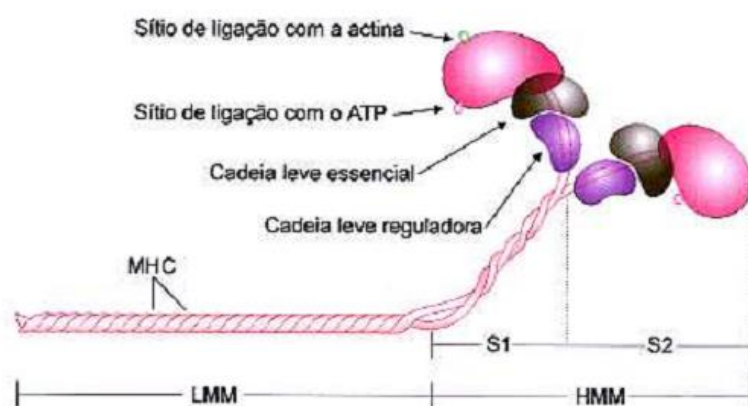


Figura 04: Esquema da molécula de miosina da classe II. Cada molécula de miosina é composta por duas cadeias pesadas de miosina (MyHC) e quatro cadeias leves de miosina (MLC). As MyHC podem ser clivadas em meromiosina leves (LMM) e pesadas (HMM). As HMM são formadas pela porção globosa S1 e porção α hélice S2. As MLC estão dispostas na proporção de duas cadeias (uma essencial e uma reguladora) para cada subfragmento S1 (Adaptado de Dal Pai-Silva et al., 2005)⁹².

A análise por microscopia eletrônica permite identificar um padrão de bandas e linhas no músculo⁹³. Essas correspondem a múltiplos sarcômeros alinhados em série⁹³. A região onde dois sarcômeros se ligam é chamada de linha (ou disco) Z⁹³. Assim, um sarcômero corresponde ao espaço que separa duas linhas Z consecutivas. De cada lado da linha Z encontra-se uma banda clara, denominada banda I, composta por filamentos finos de actina⁹³. Entre as bandas I encontra-se a banda A, mais escura, onde ocorre uma sobreposição de filamentos finos com filamentos espessos de miosina⁹³. No centro da banda A está a linha M, e a circundá-la encontra-se uma faixa estreita, mais clara, designada banda H, onde se encontram filamentos de miosina⁹³. A contração muscular ocorre por meio da interação entre os filamentos finos (actina) e grossos pela porção globular da molécula de miosina no sarcômero, após a hidrólise do ATP, pela ATPase miofibrilar (mATPase) presente na porção globular da MyHC (componente essencial para a geração de força do músculo)^{86,89} (Figura 03).

Inicialmente as primeiras classificações dos tipos de músculo separavam em “vermelhos” e “brancos”⁹⁴. A cor vermelha está relacionada com a presença do pigmento mioglobina e com o grau de vascularização do músculo. Com a utilização de técnicas histoquímicas, observou-se que a maioria dos músculos estriados dos mamíferos é constituída por uma população heterogênea de fibras, que apresentam características genéticas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas distintas⁹⁵. Inicialmente, as fibras musculares foram classificadas em vermelhas, intermediárias e brancas⁹⁶. Posteriormente, três tipos principais de fibras musculares foram descritas, sendo denominadas de fibras dos tipos I, IIA e IIB, de acordo com o padrão de reação para a atividade da ATPase miofibrilar (mATPase) na porção globular da miosina (mATPase)⁹⁷. A velocidade de contração de um músculo é diretamente proporcional a atividade da mATPase, situada na porção globular da miosina^{77,98,99}. Neste contexto, Pette & Staron (2001)¹⁰⁰, utilizando-se da reação histoquímica para a ATPase miofibrilar, da Imunohistoquímica (utilizando anticorpos específicos para isoformas de MyHC) e da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), classificaram os tipos de fibras musculares em fibras de contração lenta (slow fibers): tipo I, expressando MyHCI e as fibras de contração rápida (fast fibers): tipo II, subdivididas em tipo IIA (MyHCIIa), tipo IID (MyHCIIId) e tipo IIB (MyHCIIB). Essas são classificadas como fibras puras, uma vez que expressavam uma única isoforma de MyHC. As fibras do tipo IID (MyHCIIId) são equivalentes as fibras IIX (MyHCIIX), descritas em ratos¹⁰¹(Figura 05).

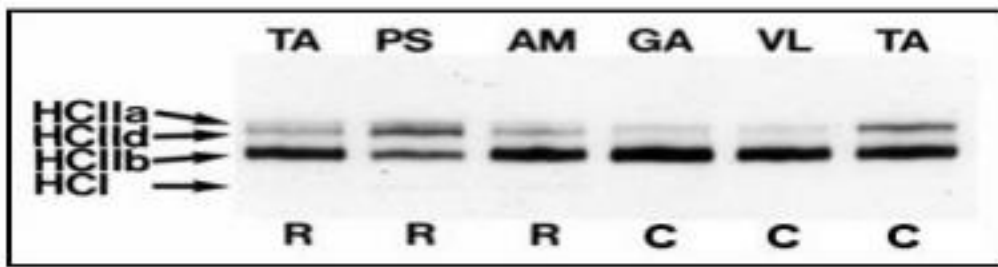


Figura 05: Separação eletroforética das isoformas de miosina de cadeia pesada (MyHC) em diferentes músculos de ratos (R) e camundongos (C). Expressão das Isoformas rápidas MyHCIIa, MyHCIIId e MyHCIIb e da Isoforma lenta MyHCI. TA, tibial anterior; PS, porção profunda do psoas; AM, adutor magno; GA, gastrocnêmio; VL, vasto lateral; TA, tibial anterior. Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE. (adaptado de Hamalainen e Pette, 1993).

Além das fibras puras, que expressam apenas um tipo de MyHC, há fibras que coexpressam diferentes genes para a MyHC¹⁰¹⁻¹⁰⁴. Essas fibras foram classificadas de acordo com o tipo de MyHC predominante, sendo assim: Tipo IC (MyHC I > MyHC IIa), Tipo IIC (MyHC IIa > MyHC I), Tipo IIAD (MyHC IIa > MyHC IIId), Tipo IIDA (MyHCIIId > MyHCIIa), Tipo IIDB (MyHC IIId > MyHC IIb) e Tipo IIBD (MyHC IIb > MyHCIIId)^{77,100,105}. Deste modo, assume-se uma organização sequencial das fibras puras, as quais são intermediadas por fibras híbridas (I ↔ IC ↔ IIC ↔ IIA ↔ IIAD ↔ IID ↔ IIDB ↔ IIB)¹⁰⁶ (Figura 06).

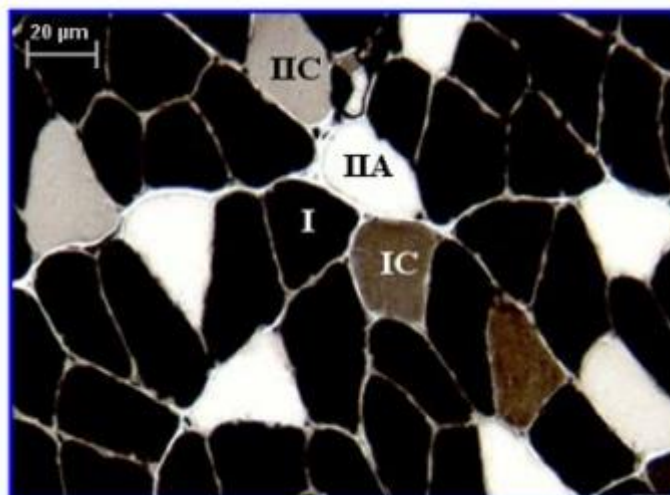


Figura 06: Corte transversal do músculo sóleo de rato. Fibras musculares puras (I e IIA) e híbridas (IC e IIC). Reação da ATPase miofibrilar, pH 4,35.

A natureza dinâmica dos tipos de fibras nos músculos de mamíferos demonstra que cada tipo de fibra apresenta diferentes atividades das enzimas metabólicas¹⁰⁷. A análise histoquímica do músculo para as atividades de enzimas mitocondriais e mATPase permite a identificação das fibras como de contração lenta e metabolismo oxidativo; de contração rápida e metabolismo glicolítico e de contração rápida e metabolismo oxidativo e glicolítico¹⁰⁸.

As fibras com metabolismo oxidativo apresentam muitas mitocôndrias, pouco glicogênio e maior número de capilares por fibra¹⁰⁷. Recebem maior teor de oxigênio, possuem elevada atividade de fosforilação oxidativa e a remoção dos produtos do metabolismo é mais rápida¹⁰⁷. As fibras com metabolismo glicolítico apresentam poucas mitocôndrias, muito glicogênio e o número de capilares por fibras é menor, sendo que o nível de oxigênio é mais reduzido^{109,110}. A identificação das características contráteis das fibras musculares é importante, pois como os músculos são compostos por vários tipos de fibras musculares, suas propriedades refletem a soma das características das fibras que o constituem. A especificidade na expressão das diferentes isoformas de MyHCs, de acordo com o tipo de fibra e músculo analisado, revela uma ampla diversidade estrutural, funcional e metabólica do músculo esquelético¹¹¹.

Essa diversidade funcional dos tipos de fibras conferem ao músculo esquelético alta capacidade para realizar uma variedade de demandas funcionais¹¹². Contudo, as fibras musculares exibem uma alta plasticidade, o que habilita este tecido a alterar suas características morfológicas, metabólicas e funcionais, como resposta a estímulos

específicos^{77,113}. Esta plasticidade muscular tem sido demonstrada em diferentes estímulos, tais como exercício de resistência (aeróbico), treinamento contra resistência (força), estimulação elétrica, desnervação e reinervação, imobilização, microgravidade, intervenção nutricional, hipoxia, envelhecimento, fatores hormonais e frente à algumas patologias^{77,114}. Os estímulos sucessivos podem provocar ajustes específicos no fenótipo das fibras musculares, a fim de suprir as necessidades do organismo, e, adaptar a função muscular¹¹⁵⁻¹²⁶. Dentre as patologias que podem causar alterações nas características do músculo esquelético destaca-se a Insuficiência Cardíaca (IC)^{54,56,65,127}. Compreender os componentes moleculares que regulam as funções musculares é requisito fundamental para compreensão da patofisiologia do músculo na IC⁷⁸.

1.7. MicroRNAs e a Regulação da Expressão Gênica

Micro-RNAs (miRNAs) são pequenos RNAs reguladores não codificantes com tamanho variando de 17 a 25 nucleotídeos (ver miRBase, <http://microrna.sanger.ac.uk/>). A definição de miRNA é baseada na sua formação pela ação da enzima RNase III (Dicer), uma RNase que processa precursores com estrutura de *hairpin* (conhecidos como pré-miRNA) originando o miRNA maduro¹²⁸. Os microRNAs regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente, primariamente pela associação com a região 3' e/ou 5' não traduzida (3' UTR, 5' UTR) de seus RNAs mensageiros alvos geralmente reprimindo e, em alguns casos, estimulando a tradução¹²⁸. Em mamíferos, é predito que 60% de todos os genes codificadores de proteínas sejam regulados por miRNAs¹²⁹ e são conhecidos por regular inúmeros processos celulares¹³⁰. Em animais, a repressão da tradução mediada por miRNA pode ocorrer de maneiras distintas¹³¹⁻¹³⁴: (a) inibição da tradução na fase inicial, ocorre interferindo a ligação dos fatores de início de tradução de eucariotos (do inglês, *eukaryotic translation initiation factors* - eIFs) e/ou impedindo a montagem do ribossomo competente na tradução. Além disso, a inibição da tradução na fase de pós-iniciação ocorre tanto por degradação do polipeptídeo nascente ou *Ribosome drop-off*, onde os ribossomos responsáveis pela tradução dos RNAs mensageiros ligados aos microRNAs e seus complexos associados (microRNPs) são induzidos a terminar a tradução precocemente^{135,136}; (b) inibição da tradução na fase de pós-iniciação, estudos sugerem que ocorra inibição do alongamento da tradução¹³⁷ uma vez que, várias miRNAs e proteínas AGO foram identificados na fração polissomal tanto em mamíferos¹³⁸ como em plantas¹³⁹. Estudos sugerem que ocorra a degradação co-tradução, ou

seja, no instante em que o pepetídio nascente emerge ele é simultaneamente degradado¹⁴⁰. Além disso, as evidências indicam que os miRNAs pode induzir a dissociação prematura dos ribossomos (*Ribossoma drop-off*) ligados aos mRNA alvo¹⁴¹; e (c) repressão da tradução induzida por deadenilação e/ou degradação subsequente do mRNA alvo. Inicialmente acreditava-se que os miRNAs represassem a tradução dos mRNAs sem alterar níveis desses¹⁴². Atualmente sabe-se que miRNAs que possuem complementaridade total a seus mRNAs alvo podem induzir diretamente clivagem destes mRNAs por endonucleases, e os miRNAs com complementaridade parcial com mRNAs alvo não podem fazê-la diretamente. Em tais casos, a maquinaria de silenciamento miRNA conduz seus alvos para vias de degradação celular, onde são deadenilados e subsequente hidrolisado o CAP expondo a extremidade 5' dos mRNAs^{143,144}. A cauda poli-A e a proteína ligadora de poli-A (poly(A)-binding protein - PABP) são importantes para melhor a tradução de mRNAs dependente de CAP por meio da interação com o eIF4G do complexo eIF4F¹⁴⁵. Estudos indicam que o CAP e a cauda poli-A são importantes para otimizar a repressão da tradução de um mRNA por um miRNA¹⁴⁶. O complexo de silenciamento por miRNA juntamente com a PABP são essenciais para a deadenilação do mRNA alvo pelo complexo deadenilase¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Após ocorrido a deadenilação, o CAP do mRNAs alvo são removido pelo complexo enzima DCP1/DCP2 decapping e finalmente degradado pela principal exonuclease citoplasmática, a XRN1 (5'-3' exoribonuclease 1)¹⁵⁰. Hussain, M UI (2012)¹⁴² sugere que a deadenilação ou mantém o mRNA alvo num estado reprimido ou induz a retirada do CAP e subsequente degradação do mRNA.

Os miRNAs são não apenas reconhecidos por reprimir a tradução, em determinadas condições podem ativar a tradução¹⁵¹. Recentemente, alguns miRNAs foram relatados por ativar a tradução de mRNA^{151,152}. Por exemplo, células sob condições de privação de soro, o complexo AGO2-miR369-3 ligado ao 3'-UTR do mRNA do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) atua recrutando a proteína FXR1 (fragile X-related protein 1) estimulando a tradução¹⁵¹. Outros exemplos do efeito estimulador de miRNAs inclui a interação do miR-10a com a região 5'-UTR de mRNAs que codificam para proteínas ribossomais estimulando a tradução destes mRNAs em resposta ao stress ou a escassez de nutrientes¹⁵². Além disso, miRNAs pode interagir diretamente na região oligopirimidina 5' terminal (5'-TOP), um *motif* característico de mRNAs que codificam proteínas ribossomais e alguns fatores de tradução. Um outro exemplo, o miR-122, um miRNA específico do fígado, estimula a tradução de RNA do vírus da hepatite C (HCV) possivelmente por aumentar a leitura pelos ribossomos da

região IRES (internal ribosome entry site) dos mRNAs¹⁵³. Com base nestes resultados, o miR-122 tem sido relatado por atuar como acompanhante que modifica a estrutura do RNA facilitando o acesso dos ribossomos ao mRNA do HCV. No entanto novos experimentos são necessário para compreender o motivo que o miR-122 aumenta a tradução ao se ligar o HCV 5'-UTR e inibindo a tradução de mRNAs ao se ligar ao 3'-UTR¹⁵⁴.

Atualmente, mais de 25141 miRNAs de 193 espécies estão registrados no banco de dado miRBase (miRBase v. 19.0, atualizado em janeiro de 2013) e esses números tem aumentado a cada ano. Os miRNAs são nomeados como miR- mais números (ex: mir-133), entretanto, existem algumas exceções. Os miRNAs de sequências similares são geralmente distinguidos por uma letra adicional seguida do número do miRNA (ex: mir-133a). Um miRNA com uma sequência madura idêntica pode aparecer em diferentes *loci* genômicos com diferentes sequências precursoras. Nesses casos, os diferentes genes de miRNA são usualmente distinguidos por outro número adicional no final da sequência (ex: mir-133a-1).

A maioria dos genes de miRNAs possuem múltiplas isoformas (parálogos), as quais são provavelmente o resultado da duplicação de genes. Por exemplo, o genoma humano possui 12 *loci* para os miRNAs da família let-7. Parálogos geralmente possuem sequências idênticas de nucleotídeos nas posições 2-7 relativa à extremidade 5' do miRNA. Como esses seis nucleotídeos, chamados de semente (*seed*, do inglês), são fundamentais no pareamento das bases com o mRNA alvo, acredita-se que os parálogos atuem de forma redundante. Entretanto, como as sequências 3' dos miRNA também contribuem para a ligação ao alvo e como o padrão de expressão desses miRNAs são geralmente diferentes entre si, membros da mesma família podem apresentar diferentes papéis *in vivo*¹⁵⁵.

Aproximadamente 50% dos *loci* de miRNA de mamíferos são encontrados muito próximos de outros miRNAs. Esses aglomerados de miRNAs são transcritos a partir de uma única unidade de transcrição policistrônica (UT)¹⁵⁶, embora existam casos excepcionais nos quais miRNAs individuais são originados a partir de promotores de genes distintos. Alguns miRNAs são gerados a partir de UT não codificantes, enquanto outros são codificados por UT que codificam proteínas (para uma revisão ver Kim et. Al., 2009¹⁵⁷). Aproximadamente 40% dos *loci* de miRNA estão localizados na região intrônica de transcritos não codificantes, enquanto aproximadamente 10% estão localizados na região exônica de UT não codificantes. Os miRNAs em UTs que codificam proteínas são geralmente encontrados em regiões intrônicas, as quais correspondem à aproximadamente 40% de todos os *loci* de miRNA.

Alguns genes de miRNAs podem estar entre os grupos de miRNA intrônicos ou exônicos, dependendo dos padrões de *splicing* alternativo.

A biogênese de um miRNA começa com a síntese de um longo transcrito primário conhecido como pri-miRNA. Os pri-miRNAs são preferencialmente transcritos pela RNA polimerase II e mantêm características tais como estrutura de *cap* na sua região 5' e cauda de poli (A) na sua região 3' ¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Entretanto, outras vias geram um conjunto menor de miRNAs, especialmente a partir de repetições genômicas. Por exemplo, a RNA polimerase III é responsável pela transcrição de miRNAs em repetições Alu ¹⁶¹.

No núcleo, o pri-miRNA é processado para pré-miRNA pela enzima RNase III (Drosha), a qual requer um cofator, a proteína DGCR8 (*DiGeorge Syndrome critical region gene 8*) em humanos (Pasha em *D. Melagonaster* e *C. Elegans*) ¹⁶²⁻¹⁶⁶. A DGCR8 forma com a Drosha um grande complexo conhecido como complexo microprocessador, que em humanos possui 650 kDa ^{163,165}. Esse complexo microprocessador reconhece e cliva o pri-miRNA, originando uma molécula com estrutura de *hairpin* de aproximadamente 70 pb, o pré-miRNA ^{167,168}. Um subconjunto de miRNAs, conhecidos como miRtrons utiliza uma via alternativa, na qual os pré-miRNA são derivados como produto secundário de um evento de *splicing*, sem a necessidade de processamento pela Drosha ¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Após o processamento nuclear, cada pré-miRNAs é exportado para o citoplasma pela exportina-5 (EXP5), membro da família de receptores de transporte nuclear ¹⁷²⁻¹⁷⁴ sendo convertido para miRNAs maduro e funcional pela Dicer ¹⁷⁵. Após a clivagem pela Dicer, a molécula de dupla fita de RNA com aproximadamente 22 nucleotídeos associa-se à proteína Argonauta para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) ¹⁵⁷. Uma das fitas de aproximadamente 22 nucleotídeos do RNA dupla fita permanece na proteína Argonauta como o miRNA maduro (fita guia ou miRNA), enquanto a outra fita (fita passageiro ou miRNA*) é degradada ¹⁷⁶. Da mesma maneira como ocorre a seleção de um siRNA ^{177,178}, a fita que possui sua extremidade 5' formando o duplex mais instável com sua fita parceira parece preferencialmente sobreviver como o miRNA no RISC ^{168,177,178}. O complexo miRNA-RISC interage com sítios ligantes da região 3' UTR do RNA mensageiro alvo inibindo a expressão ou degradando o RNA mensageiro alvo ^{179,180}. A interação entre o RNA mensageiro alvo e o complexo miRNA-RISC ocorre devido à complementaridade total ou parcial de uma sequência de 5-7 nucleotídeos do miRNA e do RNA mensageiro alvo ^{180,181}.

Estima-se que cada miRNA possa se ligar a muitos RNAs mensageiros, e que os RNAs mensageiros podem ter sua estabilidade ou tradução regulada por mais de um miRNA ¹⁸². Os

alvos de miRNAs reguladores parecem trabalhar de forma orquestrada para controlar uma via ou função biológica comum ^{183,184}; essa característica única dos miRNAs os tornam ferramentas eficientes para determinação de vias específicas envolvidas em doenças ou processos biológicos.

1.8. MicroRNAs no Músculo Esquelético

Diversos miRNAs são especificamente ou altamente expressos no músculo cardíaco e/ou esquelético. Além disso, a expressão dos miRNAs músculo-específicos (miR-1, -133, -206 e -208) é regulada por redes de transcrição envolvendo SRF, MyoD, Twist, MEF2 e miocardina ¹⁸⁵⁻¹⁸⁸. Os miRNAs músculo-específicos (miR-1, -133, -206, -208, -208b e -499) estão envolvidos em uma série de processos incluindo miogênese (proliferação, diferenciação e especificação do tipo de fibra), regeneração e hipertrofia das fibras musculares ¹⁸⁹⁻¹⁹⁵. Os miRNAs miR-208a, -208b e -499 são, cada um, codificados por um íntron de genes distintos de cadeia pesada de miosina (MyHC), respectivamente os genes MyH6 (α -MyHC), Myh7 (β -MyHC) e Myh-7. Van Rooij *et al.* ¹⁸⁷ recentemente propuseram a existência de uma rede composta por esses três miRNAs, denominada de *MyomiR*, codificada pelos genes da miosina, que está envolvida da regulação da expressão de MyHC e, potencialmente dos tipos de fibras musculares. Interessantemente, alguns miRNAs não músculo-específicos também regulam a diferenciação muscular ^{193,196} e regeneração após injúria ^{193,197}.

1.9. MicroRNAs em Doenças do Músculo Esquelético

Atualmente, embora o número de genes relacionados com o desenvolvimento de doenças musculares aumente a cada ano e a patologia histológica do tecido esteja bem documentada, as vias moleculares envolvidas permanecem pobremente compreendidas ¹⁹⁸. Porém, vários importantes estudos indicam que a expressão de miRNAs está alterada em doenças do músculo esquelético e, em alguns casos, um único miRNA pode causar a doença ^{199,200}. Um importante miRNA para o músculo esquelético, o miR-206, encontra-se elevado no músculo diafragma do camundongo mdx (também conhecido como Dmd), modelo animal de distrofia muscular ¹⁹². De maneira semelhante, foi demonstrado recentemente que o nível de expressão do miRNA músculo específico miR-499 também está aumentado num modelo

de atrofia muscular em ratos, sugerindo a ativação da rede MyomiR, codificada por genes de cadeia pesada de miosina (MyHC), nessa condição ²⁰¹. Por outro lado, os níveis de expressão do miR-1 e do miR-133a estão diminuídos num modelo de hipertrofia do músculo esquelético em camundongos ²⁰⁰. Também foi demonstrado um mecanismo envolvendo interações genéticas entre os fatores transcricionais NF-κB e YY1 e o miR-29; esse miRNA regula a diferenciação de mioblastos e funciona como um supressor tumoral em rhabdomyosarcomas, um tumor resultante da desregulação da proliferação de células progenitoras musculares ²⁰².

Estudos abrangentes do padrão de expressão de miRNAs revelaram que um total de 185 miRNAs estão alterados nas amostras de dez diferentes doenças do músculo esquelético – cinco miRNAs (miR-146b, miR-221, miR-155, miR-214 e miR-222) estavam constantemente regulados em quase todas as amostras que foram analisadas ¹⁹⁹, sugerindo um possível envolvimento de mecanismos reguladores mediados por miRNAs nas doenças musculares. Em adição a esses estudos da expressão de miRNAs em doenças musculares, uma ligação genética direta conectou o miRNA com a hipertrofia muscular ²⁰³. Uma mutação que é responsável pela excepcional muscularização da ovelha Texel foi mapeada como uma única mutação G/T dentro da região 3' UTR do RNA mensageiro que codifica a miostatina, um membro da família do fator de crescimento transformante (TGFβ); a miostatina é regulador negativo do crescimento muscular. Essa mutação cria um sítio de ligação para os miRNAs miR-1 e miR-206, levando à repressão da tradução da miostatina, a qual origina um fenótipo semelhante à “dupla musculatura” resultante da perda da miostatina em camundongos, ratos e humanos ^{204,205}.

1.10. MicroRNAs e Alterações Musculares na Insuficiência Cardíaca

Os primeiros estudos do perfil global de expressão de miRNAs em corações hipertrofiados de murinos e de humanos revelaram um conjunto comum de miRNAs que estão elevados em corações hipertróficos ^{194,206–208}. Um desses miRNAs, o miR-195, foi demonstrado ser suficiente para induzir IC e morte devido à perda de células musculares cardíacas quando super-expressos em corações de camundongos transgênicos sob o controle de um promotor específico do coração ²⁰⁸. O perfil de expressão de miRNAs desregulados após Infarto do Miocárdio (IM) em camundongos demonstrou que a família de miRNAs miR-29 tem sua expressão diminuída após IM e controla a fibrose cardíaca através da regulação direta da expressão de colágeno ²⁰⁹. Adicionalmente, o perfil global de miRNAs em diferentes

formas de doenças cardíacas demonstraram que assinaturas de expressão gênica de miRNAs são específicas para doenças cardíacas distintas porém relacionadas, tais como cardiomiopatia, cardiomiopatia isquêmica e estenose aórtica ²¹⁰. Embora vários estudos já tenha sido conduzidos para compreender o papel dos miRNAs do músculo cardíaco na IC, não existe dado na literatura sobre o papel dessas pequenas moléculas de RNAs na miopatia do músculo esquelético.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo é determinar o perfil global de expressão de microRNAs na miopatia esquelética de ratos com insuficiência cardíaca (IC).

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do presente estudo são analisar na miopatia esquelética de ratos com insuficiência cardíaca (IC):

- a atrofia e a proporção dos tipos de fibras musculares;
- a expressão gênica dos componentes de vias proteolíticas do músculo esquelético Runx1, Ctss, e Capn2;
- a expressão gênica e proteica dos atrogenes MAFbx e Murf1;
- a expressão gênica e estabilidade de 16 genes de referência (mRNA);
- a expressão gênica de marcadores moleculares da transição dos tipos de fibras Myh7, Myh7b, TnnI1, TnnI2 e TnnT3;
- a expressão proteica das cadeias pesadas de miosinas MyHCI e MyHCIIa;
- a estabilidade dos microRNAs de referência;
- a expressão global de microRNAs;
- a(s) potenciais via(s) reguladas pelos microRNAs alterados nessa condição;
- a expressão gênica e proteica do NF- κ B e TNF- α envolvidos na via NF-KB-YY1-miR-29b.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e protocolo experimental

Todos os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com os princípios definidos pela Comissão de Ética da Experimentação Animal - CEEA - IB – UNESP, Botucatu (protocolo nº 201). Neste estudo foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso corporal de 250 a 300 g, provenientes do Biotério Central - UNESP - Campus de Botucatu - SP. A Hipertrofia Ventricular Direita (HVD) e a Insuficiência Cardíaca (IC) foram induzidas pela injeção de monocrotalina (C 2401 - Sigma), que induz severa hipertensão arterial pulmonar, seguida de HVD e IC, sem acarretar, per si, alterações na musculatura esquelética^{62,211}. Foram utilizados dois grupos experimentais:

Grupo IC – animais com insuficiência cardíaca (n= 6);

Grupo CT – animais controles da insuficiência cardíaca (n= 6).

A monocrotalina foi injetada intraperitonealmente numa única dose (60 mg/kg i.P.). Esses animais receberam ração e água *ad libitum*. No grupo CT, foi injetada solução salina e esses receberam a mesma quantidade de ração consumida, no dia anterior, pelo grupo IC.

Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais, à temperatura de 23°C e com ciclos de luminosidade de 12 horas, no Biotério do Laboratório Experimental do Departamento de Morfologia – IB – UNESP – Botucatu.

Os animais foram observados diariamente para a detecção dos sinais compatíveis com o diagnóstico clínico de IC, como taquipnéia e dispnéia. A presença de IC foi confirmada, no sacrifício dos ratos, pela presença de derrame pleural, ascite, trombo em átrio direito e hipertrofia do ventrículo direito⁶⁷. Os sintomas de IC foram visualizados após 30 dias da injeção de monocrotalina; nesse momento os animais foram sacrificados mediante decapitação.

3.2. Estudo dos parâmetros anatômicos

No momento do sacrifício, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg i.P.) e, em seguida, mensurados o peso corporal (PC). Os ventrículos (esquerdo e direito) foram dissecados e pesados separadamente. As relações entre o peso dos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD) sobre o peso corporal (PC) dos ratos

(VE/PC e VD/PC) foram utilizadas como índices de hipertrofia dos ventrículos. Os músculos sóleo (Sol) foram retirados; o Sol direito e esquerdo foram separados em duas porções (distal/proximal) e congelados em nitrogênio líquido. O músculo Sol direito foi destinado à determinação da frequência dos tipos de fibras e da área de secção transversal dos tipos de fibras musculares (I, Ic/Iic e IIa); e o músculo Sol esquerdo foi utilizado para a avaliação da expressão gênica por RT-qPCR e proteica por western blotting.

3.3. Determinação da frequência dos tipos de fibras musculares

Os fragmentos musculares utilizados para a determinação da área e frequência das fibras musculares foram congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido e armazenados em Biofreezer (- 80 °C). A análise dos tipos de fibras (I, Ic/Iic e IIa) da porção proximal do músculo sóleo foi realizada em cortes histológicos transversais de 10µm pela reação histoquímica m-ATPase (*miotibrillar adenosine triphosphatase*) após pré incubação em pH 4,2²¹². Foi determinada a frequência dos tipos de fibras de cada animal, utilizando-se Sistema de Análise de Imagens Qwin (Leika, Alemanha).

3.4. Análise das Cadeias Pesadas de Miosinas (MyHC)

A análise da expressão das cadeias pesadas de miosinas (MyHC) foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida duodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram utilizados 12 cortes transversais (10 µm de espessura) de músculo, colocados em 0,5mL de uma solução contendo 10 % glicerol, 5 % 2-mercaptoetanol, 2,3 % SDS, 0,9 % Tris-HCl por 10 minutos, a 60°C para homogeneização, a qual também foi mediada sob agitação em vortex. Desse homogeneizado foi aplicado 5 µl em gel de poliacrilamida gradiente de 10 % com um gel de empacotamento a 4 %, com 26 horas de corrida a 180 V, e em seguida, corado com Coomassie Blue. As isoformas das cadeias pesadas das miosinas foram identificadas de acordo com seus pesos moleculares, os géis foram fotografados e analisados pelo *VDS Software* (Pharmacia Biotech) e a porcentagem relativa quantificada por densitometria usando o *Image Master VDS Software* (versão 3.0).

3.5. Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR).

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do *MIQE: Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment*²¹³.

a) Extração de RNA total

A extração do RNA foi realizada com o kit TriZol (Ambion, EUA) segundo as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoVue (GE Healthcare Life Sciences, EUA). As amostras de RNA foram tratadas com DNA-free[™] Kit (Ambion, EUA) para remover a contaminação com DNA genômico.

b) Análise da qualidade do RNA

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)^{214,215}. O Bioanalyzer fornece um número de integridade do RNA (RIN-RNA Integrity Number) que varia de 1 a 10, onde 1 refere-se a um RNA degradado e 10 a um RNA íntegro²¹⁴. Todas as amostras de RNA foram estocadas em alíquotas a -80°C

c) Reação de Transcrição Reversa (miRNA):

A transcrição reversa dos miRNAs obtidos do músculo esquelético foi realizada utilizando o kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, EUA) combinado com o Stem-loop Megaplex[™] RT Primers (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Esse sistema permitiu a transcrição reversa apenas de miRNAs maduros e não é afetado pela contaminação com DNA genômico. Para a reação foram utilizados 3 µL (500 ng) de RNA total ao qual foram adicionados os seguintes componentes do kit: Megaplex[™] RT Primers (10X), dNTPs with dTTP (100 mM), MultiScribe[™] Reverse Transcriptase (50 U/µL), 10X RT Buffer, RNase Inhibitor (20 U/µL) e o volume completado para 4,5 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 seg. seguido, da inativação da transcriptase reversa a 85 °C por 5 min.

d) PCR quantitativo em Tempo Real (miRNA)

Cada amostra de cDNA foi analisada com o *TaqMan Low Density Array Rodent MicroRNA A+B Cards Set v2.0* (Life Technologies, EUA), constituído por duas placas de PCR de 384 poços com primers e sondas de hidrólise específicos que permitiu a identificação de 303 miRNAs maduros e 5 genes de referência (87% de cobertura do miRBase v. 10) (figura suplementar 1). Cada ensaio (primers e sonda) é capaz de discriminar miRNAs maduros que diferem em apenas uma base, utilizando-se pequena quantidade de RNA inicial^{216,217}. Como demonstrado por Mestdagh *et al.*²¹⁷, as variações do instrumento e manipulação dos líquidos é mínima nesse sistema e, portanto, não é necessário a realização de réplicas da PCR. Para cada placa, foram utilizados 450 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (2X), 6 µL do produto da reação de transcrição reversa e o volume final ajustado para 900 µL com água livre de nucleases. Foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem: 95 °C por 10 min., seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15s e 60 °C por 1 min.. As reações foram realizadas no Sistema de PCR em Tempo Real Viiia7 (Life Technologies, EUA). Os valores de Cq foram calculados utilizando o software SDS 2.1, utilizando a configuração automática de baseline e um threshold de 0,2. O Cq (ciclo de quantificação) refere-se ao ponto de encontro entre a curva de amplificação corrigida pelo baseline e o threshold (de acordo com o RDML, [HTTP://rdml.org](http://rdml.org))²¹⁸. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método do Cq comparativo²¹⁹. A análise do perfil de expressão dos miRNAs e a seleção dos microRNAs de referência para a normalização da RT-qPCR foram realizadas utilizando-se os softwares *ExpressionSuite* (Life Technologies, EUA) e *RealTime StatMiner*® (*Integromics*, Espanha). Esse software permite a análise da estimativa da estabilidade de expressão dos genes candidatos à referência utilizando o algoritmo do *geNorm*; esse algoritmo foi desenvolvido por Vandesompele *et al.*, 2002²²⁰ e é amplamente utilizado na literatura para determinar os genes de referência mais estáveis para um determinado grupo de amostras.

e) Reação de Transcrição Reversa (mRNA)

A transcrição reversa dos mRNAs obtidos do músculo esquelético foi realizada utilizando o *kit High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Para a reação foram utilizados 4 µL de Master Mix para a transcrição reversa ao qual foi adicionado 1 µg de RNA e o volume completado para 20 µL com água livre de nucleases. A mistura foi incubada nas seguintes condições: 25 °C por 5 min., 42 °C por 30 min, seguido da inativação da transcriptase reversa a 85 °C por 5 min.

f) PCR quantitativo em Tempo Real (mRNA)

Para cada reação foram empregados 10 µL de GoTaq® qPCR Master Mix, baseado na química SYBR Green (Promega, EUA), 5 µL da reação de RT e 2 µL de iniciadores “sense” e “anti-sense” a 5 µM e o volume foi completado para 20 µL com água livre de nucleases. Os iniciadores para os genes alvo Runx1, Ctss, Capn2, MAFbx, Murf1, Myh7b, TnnI1, TnnI2, TnnT3, NF-κβ, TNF-α, Ppib, Ppia e B2m foram desenhados utilizando-se o programa Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (tabela 1). As reações foram realizadas no sistema 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA), obedecendo as seguintes condições: GoTag Hot Start Polymerase ativação 2 min. a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 seg. a 95°C e 1 min. a 60°C, por fim curva de dissociação 60-95°C.

Tabela 1. Genes e informações dos iniciadores utilizados na RT-qPCR.

Gene	NCBI REF Seq	Sequência dos Iniciadores	Amplicon (pb)
Runx1	NM_017325.1	5'CCCCGAAGACATCGGCAGAA 5'CACTGAGCCGCTCGGAAAAG	73
Ctss	NM_017320.1	5'GGGCAGCTGAAGCTGAAAAC 5'TTCGGTTGAGCAATCCACCA	72
Capn2	NM_017116.2	5'GGCCGTTACGTACCAGAAGT 5'TGAGCTTTCAACCTCCTCGG	73
Murf1	NM_080903.1	5'TGCCCTGCCAGCACAAC 5'GGATTGGCAGCCTGGAAGAT	61
MAFbx	NM_133521.1	5'GACCTGCATGTGCTCAGTGAAG 5'GGATCTGCCGCTCTGAGAAGT	76
MyH7b	NM_001107794.2	5'AAGCAGAGAGAGGAGCAAGCAGAA 5'ACTTTCACCTCGAGGGTGAAGCAGT	92
TnnI1	NM_017184.1	5'AGCGCCCTTCAGGACTTATG 5'TGGAGGCATTTGGCTTCGAT	89
TnnI2	NM_017185.1	5'GCACCTGAAGAGTGTGATGC 5'GTTCTGCTTCTCGGATTCGC	82
TnnT3	NM_001270664.1	5'GCGTCAGAACAAGGACCTCA 5'GCACGGCGCTTTTCAATTCT	117
Rel A	NM_199267.2	5'CTGGCCATGGACGATCTGTT 5'TCCACATATGGCCCAGAAGC	71
TNF- α	NM_012675.3	5'GCCACCACGCTCTTCTGTCT 5'GTCTGGGCCATGGAAGTCTGAT	101
Ppib	NM_022536.1	5'CAAGACCTCCTGGCTAGACG 5'CCGTACCACATCCATGCCTT	70
Ppia	NM_017101.1	5'TCAACCCACCGTGTTCTTC 5'ACTTTGTCTGCAAACAGCTCG	82
B2m	NM_012512.2	5'CGAGACCGATGTATATGCTTGC 5'GTCCAGATGATTCAGAGCTCCA	114

NCBI REF Seq: sequência de referência NCBI; pb: pares de bases; Runx1 (*runt-related transcription factor 1*); Ctss (*cathepsin S*); Capn2 (*calpain 2, (m/II) large subunit*); Murf1 (*tripartite motif containing 63*); MAFbx (*F-box protein 32*); Myh7b (*myosin, heavy chain 7B*); TnnI1 (*troponin I type 1*); TnnI2 (*troponin I type 2*); TnnT3 (*troponin T type 3*); Rel A (*v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A*); TNF- α (*tumor necrosis factor*); Ppib (*peptidylprolyl isomerase B*); Ppia (*peptidylprolyl isomerase A*) e B2m (*beta-2 microglobulin*).

Para a normalização dos resultados da RT-qPCR, foram inicialmente utilizadas 12 amostras para a avaliação de 16 genes de referência presentes no *Rat Endogenous Control Array* (Life Technologies, EUA) (figura suplementar 2). Para cada amostra, foram utilizados 50 µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (2X)*, 15 µL do produto da reação de transcrição reversa e o volume final ajustado para 100 µL com água livre de nucleases. Foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem: 95 °C por 10 min., seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15s e 60 °C por 1 min.. As reações foram realizadas no Sistema de PCR em Tempo Real Viiia7 (Life Technologies, EUA). Os valores de Cq foram calculados utilizando o software SDS 2.1, utilizando a configuração automática de baseline e um threshold de 0,2. A análise do perfil de expressão dos microRNAs e a seleção dos transcritos de referência para a normalização da RT-qPCR foram realizadas utilizando-se o software RealTime StatMiner® (Integromics, Espanha). A quantificação relativa de cada mRNAs foi realizada com o *REST software 2009 v. 2.0.13* com teste fixo de randomização pareada com 2000 permutações²²¹ utilizando os valores de Cq e a eficiência de amplificação de cada transcrito calculada pela regressão linear do aumento de fluorescência na fase exponencial com o programa *LinRegPCR v 11.1*²²².

3.6. Western Blotting

Os níveis de proteína do músculo sóleo foram analisados por Western blotting utilizando os anticorpos específicos anti-NF-KB (sc8008), anti-TNF α (sc1349), anti-Murf1 (sc27642) e anti MAFbx (sc27644) e os níveis de cada proteína foram normalizados pela β -actina (sc47778). As proteínas musculares foram extraídas utilizando Tris-tampão Triton (Tris 10 mM, pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% de Triton X-100, glicerol 10%, SDS a 0,1%, desoxicolato a 0,5%) e a quantidade de proteína do sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford. As amostras foram separadas em gel de poliacrilamida (*mini-protean TGX gels*, Bio-Rad, EUA) e, em seguida, transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, EUA). Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário no sistema *Snap i.d.* (Millipore, EUA). Posteriormente, a membrana foi lavada com TBS e Tween 20 e incubadas no *Snap i.d.* com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. O *Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce Protein Research Products, EUA) foi utilizado para detectar anticorpos ligados. As membranas foram fotografadas utilizando o sistema *IQuant Capture 350* e analisada a densitometria pelo

ImageQuant TLV2005 (GE Healthcare, EUA) para determinar o teor relativo de cada proteína.

3.7. Análise Estatística

Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se teste *t-Student*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Indução de Insuficiência Cardíaca e Estudo dos Parâmetros Anatômicos

Ao final do experimento, todos os animais do grupo IC apresentaram sinais clínicos e patológicos de insuficiência cardíaca (taquipnéia, ascite e derrame pleural); nenhuma alteração foi encontrada nos animais controles. Houve aumento estatisticamente significativo dos seguintes parâmetros: AT, AT/PC, VD e VD/PC, do grupo IC em relação ao grupo CT (tabela 2).

Tabela 2: Dados Anatômicos

	CT (n = 6)	IC (n = 6)	
PI (g)	268,4 ± 14,2	263,1 ± 12,6	
PC (g)	344,6 ± 12,6	255 ± 13,7	***
VE (mg)	0,69 ± 0,03	0,60 ± 0,06	*
VD (mg)	0,20 ± 0,03	0,49 ± 0,04	***
AT (mg)	0,10 ± 0,01	0,19 ± 0,03	***
VE/PC (mg/g)	1,99 ± 0,17	2,35 ± 0,21	**
VD/PC (mg/g)	0,58 ± 0,06	1,94 ± 0,23	***
AT/PC (mg/g)	0,28 ± 0,03	0,76 ± 0,11	***

CT: controle; IC: insuficiência cardíaca; n: número de animais; PI: peso corporal inicial; PC: peso corporal final; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; AT: átrio. Dados são expressos como média ± desvio padrão. Os valores de P foram obtidos pelo teste *t-Student*. * P<0,05; ** P<0,001; *** P<0,0001: estatisticamente significante *versus* grupo controle.

4.2. Atrofia e frequência das fibras musculares

Corte transversal do músculo corado com HE (Hematoxilina Eosina) apresentando uma visão geral do músculo sóleo de ratos controle e insuficiência cardíaca (figura 7).

A análise histoquímica do músculo sóleo pela reação da trifosfatase de adenosina miofibrilar (m-ATPase), após pré-incubação em pH 4,2, permitiu a determinação da atrofia e da frequência dos tipos de fibras I, IIa e Ic/IIc (figura 8).

A atrofia muscular no grupo IC foi comprovada pela diminuição significativa ($P < 0,05$) da área das fibras musculares dos tipos I, Ic/IIc e IIa (figura 9). A transição dos tipos de fibras musculares no grupo IC também foi confirmada; houve aumento estatisticamente significativo na porcentagem relativa dos tipos IIa e diminuição da fibras do tipo I, no grupo IC comparado aos grupo controle (figuras 8 e 10).

A análise da expressão das cadeias pesadas das miosinas (MyHC), realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida duodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), corroboram os resultados da análise da frequência dos tipos de fibras musculares. O músculo sóleo apresentou as isoformas MyHCI e MyHCIIa; houve aumento estatisticamente significativo na porcentagem relativa da MyHCIIa e diminuição da MyHCI, no grupo IC comparado aos grupo controle (figura 11).

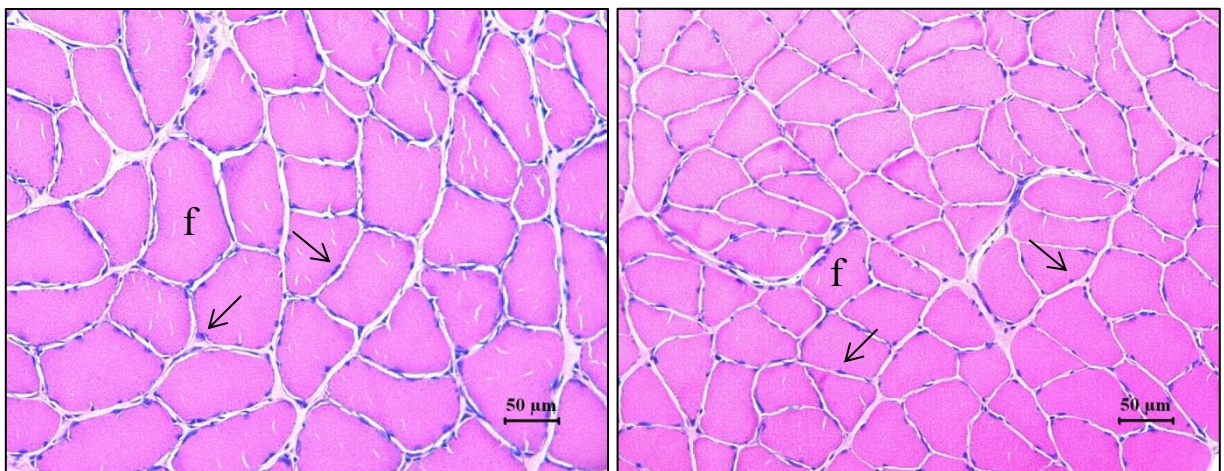


Figura 7: Secções transversais do músculo sóleo corado com HE (Hematoxilina-Eosina) demonstrando uma visão geral da morfologia das fibras (f) do músculo sóleo dos grupos controle (esquerda) e insuficiência cardíaca (direita). Objetiva: 20x.

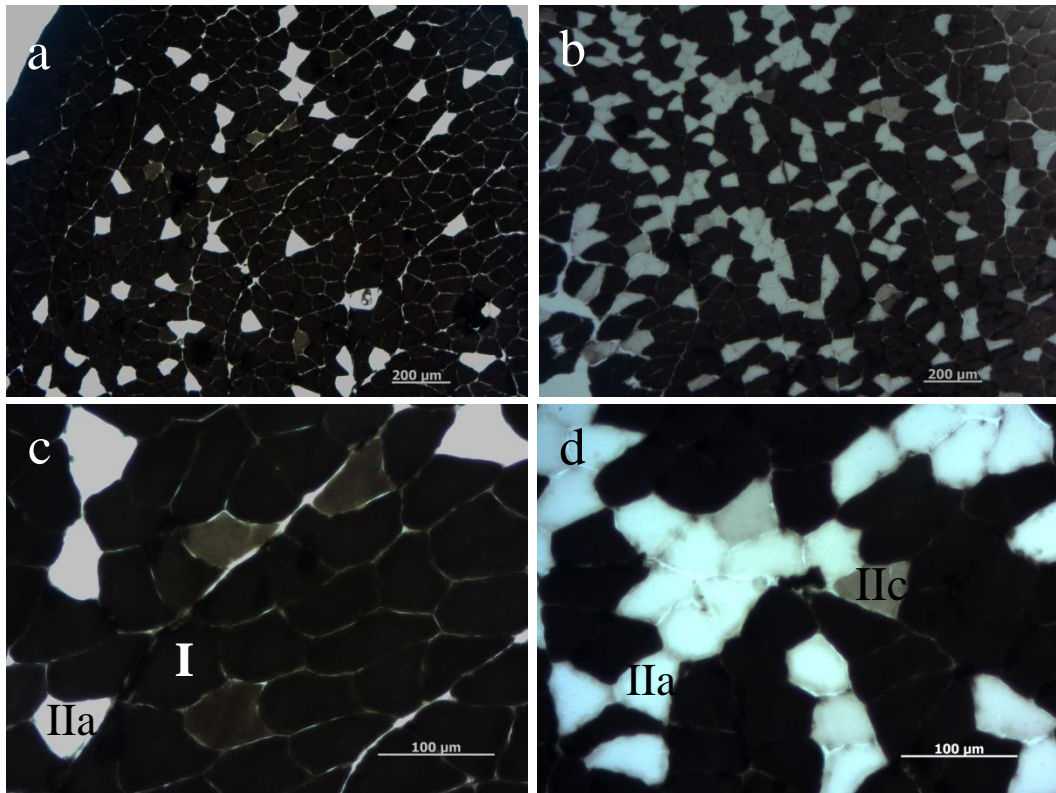


Figura 8: Secções transversais do músculo sóleo demonstrando a distribuição dos tipos de fibras através da reação histoquímica da trifosfatase de adenosina miofibrilar (m-ATPase) após pré-incubação em pH 4,2. a) grupo controle; b) grupo insuficiência cardíaca (objetiva: 10x); detalhe dos tipos de fibras musculares (I, IIa e Ic/IIc) nos grupos controle (c) e insuficiência cardíaca (d) (objetiva: 20x).

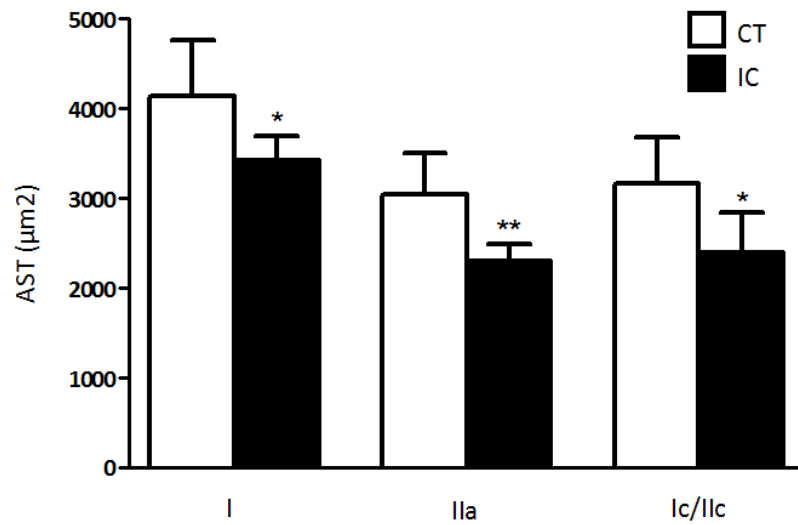


Figura 9: Área de Secção transversal (AST; μm^2) dos tipos de fibras musculares (I, IIa, e Ic/IIc) após coloração pela reação ATPase miofibrilar (m-ATPase), nos grupos controle (CT) e insuficiência cardíaca (IC). Dados são expressos como média \pm desvio padrão. Os valores de P foram obtidos pelo teste t-Student. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$: estatisticamente significativa *versus* grupo controle.

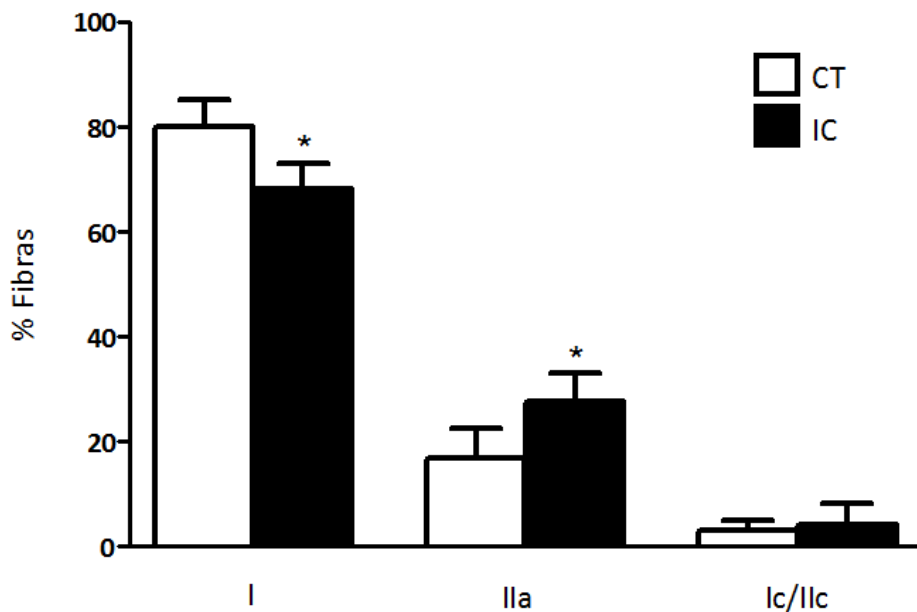


Figura 10: Análise da frequência (%) dos tipos de fibras musculares (I, IIa, e Ic/IIc) no músculo sóleo após coloração pela reação m-ATPase nos grupos controle (CT) e insuficiência cardíaca (IC). Dados são expressos como média \pm desvio padrão. Os valores de P foram obtidos pelo teste t-Student. * $P < 0,05$: estatisticamente significativa *versus* grupo controle.

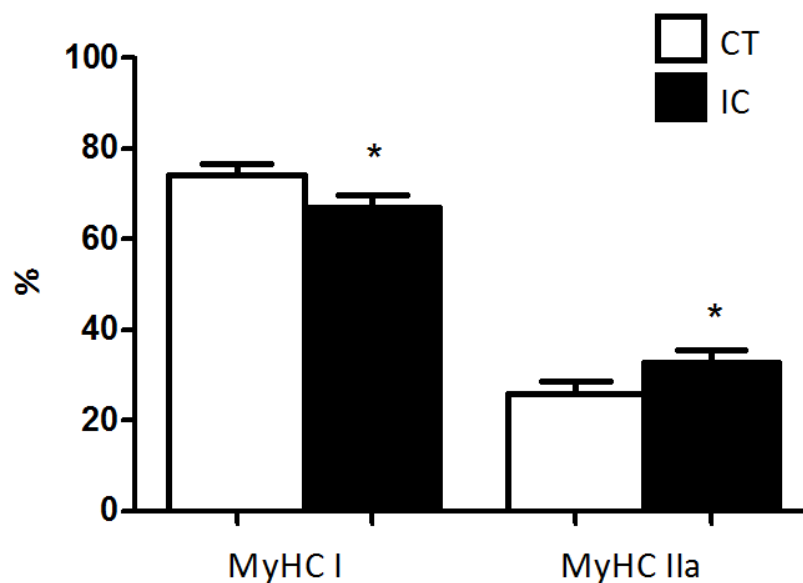


Figura 11: Análise das isoformas de miosina (MyHC) utilizando SDS-PAGE no músculo sóleo dos grupos controle (CT) e insuficiência cardíaca (IC). MyHCI: cadeia pesada de miosina I; MyHCIIa: cadeia pesada de miosina IIa. Dados são expressos como média \pm desvio padrão. Os valores de P foram obtidos pelo teste t-Student. * $P < 0,05$: estatisticamente significante versus grupo controle.

4.3. Extração e análise da qualidade do RNA

O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Life Technologies, EUA), segundo as recomendações do fabricante. O RNA extraído foi eluído em água ultra pura livre de nucleases. A análise espectrofotométrica das amostras de RNA apresentou razão 260/280 nm $> 1,8$ (tabela 02). A qualidade do RNA, determinada pelo número da integridade do RNA (*RNA Integrity Number*, RIN), foi de $8,75 \pm 0,43$ (média \pm desvio padrão) (tabela 3).

Tabela 3: Qualidade do RNA.

Grupo	Amostra	[ng/ μ L]	260/280 nm	RIN
CT	A	948,8	1,921	8,9
	B	1356	1,798	8,3
	C	1170	1,886	9,3
	D	1093	1,896	8,4
	E	1284	1,831	9,0
	F	1220	1,861	8,9
IC	G	784	1,936	8,0
	H	862	1,933	8,8
	I	1143	1,896	8,4
	J	623	1,925	9,2
	K	774	1,939	8,3
	L	1202	1,864	9,5

CT: grupo controle; IC: grupo insuficiência cardíaca. RIN: *RNA Integrity Number* (número de integridade do RNA). O valor de RIN apresentou $8,75 \pm 0,43$ (média \pm desvio padrão).

4.4. Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR).

O RNA livre de DNA genômico foi submetido à reação de transcrição reversa e o gene TBP (Tata Box Binding Protein; NM_001004198) de todas as amostras, incluindo controles positivos e negativos, foi amplificado utilizando a qPCR para verificar a presença de inibidores. Os primers utilizados para a qPCR foram: F-TGGGATTGTACCACAGCTCCA e R-CTCATGATGACTGCAGCAAACC (tamanho do amplicom = 132pb). Todas as amostras apresentaram o mesmo perfil de amplificação e foram utilizadas para a análise da expressão gênica por RT-qPCR (micro-RNAs e RNAs mensageiros) (dados não apresentados).

4.4.1. Escolha de transcritos referência para normalização da RT-qPCR

Considerando que o número limitado de relatos sobre transcritos estáveis no músculo esquelético na insuficiência cardíaca para uso como referência em ensaios de RT-qPCR, os 16 genes de referência presentes no *Rat Endogenous Control Array (Life Technologies, EUA)* foram testadas todas as amostras. Apenas dois genes de referência não apresentaram amplificação e os demais 14 candidatos a normalizadores demonstram coeficiente de estabilidade (M) de expressão abaixo do limiar de 1,5 sugerido por Vandesompele *et al.*, 2002²²⁰ (Figura 12). O coeficiente de estabilidade de expressão (M) é determinado partindo do princípio de que dois genes de referência ideais possuem razões de expressão idênticas em todas as amostras a serem analisadas, independente de quaisquer condições experimentais ou tipos celulares. O algoritmo *geNorm* avalia a razão de expressão de cada gene referência em relação aos demais sempre aos pares, o que permite a exclusão dos transcritos menos estáveis²²⁰.

Nesta análise, Ppia e B2m demonstraram a expressão mais estável (M=0,320) e 18S menos estável (M=1,498) entre as amostras avaliadas. Após a remoção em série dos genes com maior variação entre as amostras, o algoritmo *geNorm* indicou o uso dos genes Ppib + Ppia + B2m como o melhor conjunto de transcritos, seguidos dos seguintes genes em ordem crescente de estabilidade: Tfrc, Actb, Hmbs, Ubc, Hprt, Rplp2, Gapdh, Pgk1, Arbp, Ywhaz (Figura 12).

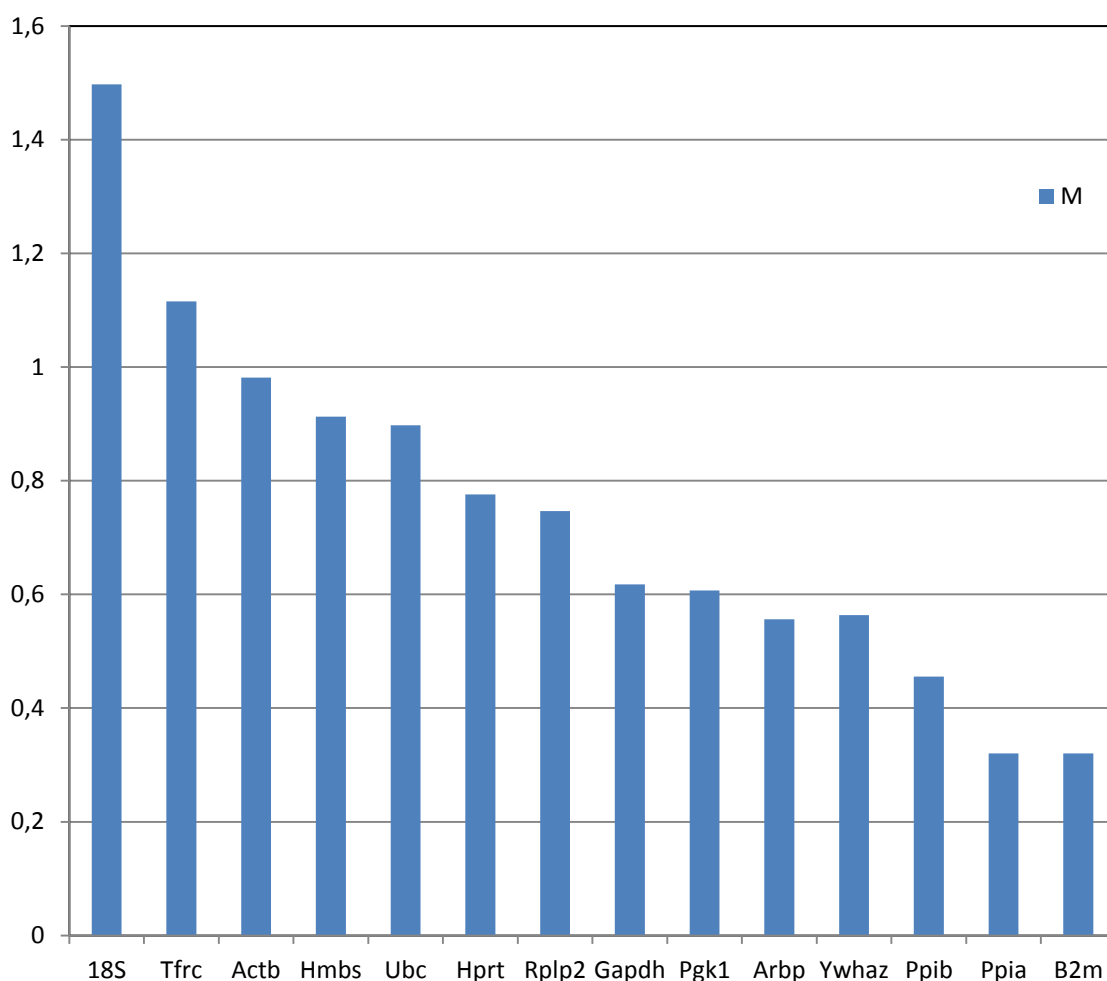


Figura 12: Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos transcritos de referência 18S, Tfr, Actb, Hmbs, Ubc, Hprt, Rplp2, Gapdh, Pgk1, Arbp, Ywhaz, Ppib, Ppia e B2m. O cálculo para a determinação dos melhores genes de referência após a exclusão progressiva dos genes de expressão menos estável indicando Ppib+B2m como os mais estáveis, com o mesmo valor de estabilidade de expressão.

O conjunto de genes referência apropriado também foi estimado e essa análise mostrou que deveriam ser utilizados dois ou três genes de referência. O desvio ideal entre os fatores de normalização (V) foi obtido com a utilização de apenas dois transcritos Ppia e B2m e, a inclusão do terceiro transcrito Ppib ao grupo prévio com os dois não altera o resultado (V2/3) (Figura 13). Portanto, com a utilização de apenas três transcritos de referência foi possível atingir o valor $V < 0,15$, como proposto por Vandesompele *et al.* 2002²²⁰.

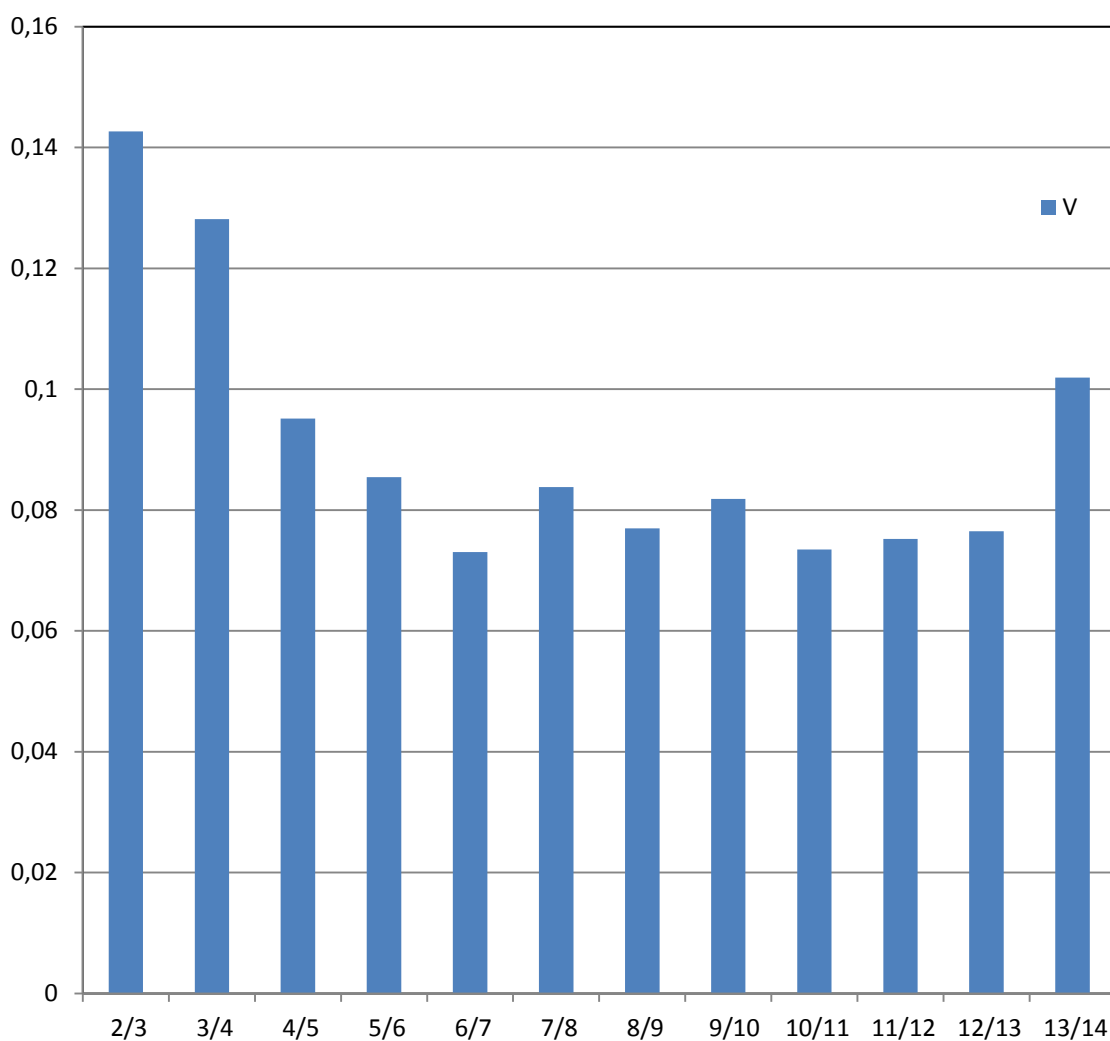


Figura 13: Determinação do número adequado (V) de genes de referência. Estimativa para o uso do número ideal de genes para a normalização, demonstrando que com o uso dos três transcritos (2/3) já se obtém a normalização ideal utilizando Ppia+Ppib+B2m. Essa análise estima o número de genes de referência mais apropriado pelo impacto da adição em sequência dos mais estáveis na relação aos fatores de normalização.

4.4.2. Expressão relativa de genes associados à atrofia e transição dos tipos de fibras musculares

Para maior compreensão dos mecanismos responsáveis pela atrofia muscular na insuficiência cardíaca, analisamos inicialmente a expressão gênica de componentes de vias proteolíticas do músculo esquelético, incluindo Runx1 (sistema proteossomal dependente de ubiquitina), Ctss (catepsina, protease de cisteína lisossomal) e Capn2 (calpaína, protease de cisteína dependente de cálcio) (tabela 4). Foi observado um aumento significativo dos níveis de expressão dos genes Ctss e Runx no grupo IC quando comparado ao grupo controle ($P=0,0019$ e $P<0,001$, respectivamente). Não foi observada alteração significativa do nível de expressão do gene Capn2.

Como marcadores moleculares da transição dos tipos de fibras musculares, avaliamos a expressão dos genes Myh7b e Tnn11, que caracterizam fibras lentas, e dos genes Tnn12 e TnnT3, que caracterizam fibras rápidas (tabela 4). Foi observada uma diminuição significativa do nível de expressão do gene Tnn11 no grupo IC quando comparado ao grupo controle ($P<0,001$). Não foi observada alteração significativa do nível de expressão dos genes Myh7b, Tnn12 e TnnT3.

Tabela 4: Expressão relativa de genes envolvidos na atrofia e na transição dos tipos de fibras musculares.

	Gene	Expressão Relativa	Eficiência Reação
Transcrito de Referência	B2m	0,916	0,852
	Ppia	0,908	0,901
	Ppib	1,201	0,944
Atrofia	Murf1	4,277 ***	0,781
	MAFbx	1,685 **	0,879
Transição dos Tipos e Fibras	MyH7b	0,899	0,972
	TnnI1	0,390 ***	0,876
	TnnI2	0,700	0,849
	TnnT3	0,890	0,891
Proteólise	Ctss	1,862 *	0,900
	Cpn2	0,996	1,028
	Runx1	2,033 ***	0,919
Via NF- κ B,YY1, miR 29b	TNF- α	0,561 *	0,875
	Rel A (p65)	1,051	0,982

Expressão relativa de Runx1, Ctss, Capn2, MAFbx, Murf1, Myh7b, TnnI1, TnnI2, TnnT3, NF- κ B e TNF- α estimada por RT-qPCR no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca em relação ao grupo controle. A expressão de cada transcrito foi normalizada pela expressão de Ppib, Ppia e B2m. Estatisticamente significativo *versus* grupo controle (*P < 0,05; **P<0,001).

4.4.3. Expressão gênica e proteica dos atrogenes Murf1 e MAFbx

Posteriormente, analisamos a expressão gênica e proteica dos atrogenes Murf1 e MAFbx, os quais são altamente regulados em diversas condições de atrofia muscular. Foi observada uma diminuição significativa dos níveis de expressão dos genes Murf1 e MAFbx no grupo IC quando comparado ao grupo controle ($P < 0,001$ e $P = 0,004$, respectivamente) (Tabela 4). Os resultados para a expressão das proteínas estudadas pelo Western Blotting mostraram que houve aumento da expressão de MAFbx no grupo IC em relação ao grupo CT; não houve diferença estatística na expressão da proteína Murf1 entre grupos (Figura 14).

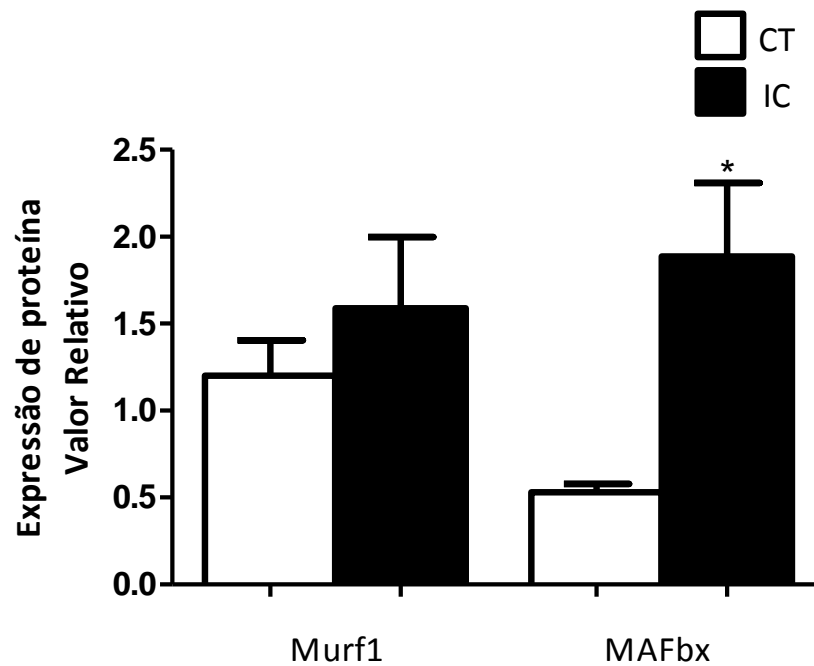


Figura 14: Expressão relativa das proteínas Murf1 e MAFbx no músculo sóleo dos animais dos grupos controle (CT) e insuficiência cardíaca (IC) analisados por Western blotting. Dados foram normalizados pela proteína beta actina e são expressos como média \pm desvio padrão. Os valores de P foram obtidos pelo teste *t-Student*. * $P < 0,05$: estatisticamente significante *versus* grupo controle.

4.4.4. Escolha de miRNAs referência para normalização da RT-qPCR

Para realizarmos uma análise global do *TaqMan Low Density Array Rodent MicroRNA* que incluísse as placas A+B, totalizando 303 miRNAs maduros, analisamos inicialmente a estabilidade dos cinco RNAs não-codificantes de referência (MammU6, U87, Y1, snoRNA135 e snoRNA202) presentes em ambas as placas (A+B). Foram testadas todas as amostras e os RNAs não-codificantes de referência MammU6, U87, Y1, snoRNA135 e snoRNA202 candidatos a normalizadores apresentaram amplificação; com exceção do snoRNA202, todos os demais RNAs não-codificantes de referência esses genes demonstram coeficiente de estabilidade (M) de expressão abaixo do limiar de 1,5 sugerido por Vandesomepele *et al.*, 2002²²⁰ (Figura 15).

Nesta análise, MammU6 demonstrou a expressão mais estável (M=0,278) e snoRNA202 a menos estável (M=3,174). Após a remoção em série dos genes com maior variação entre as amostras, o algoritmo *geNorm* indicou o uso de MammU6, U87, Y1 e snoRNA135 (Figura 15).

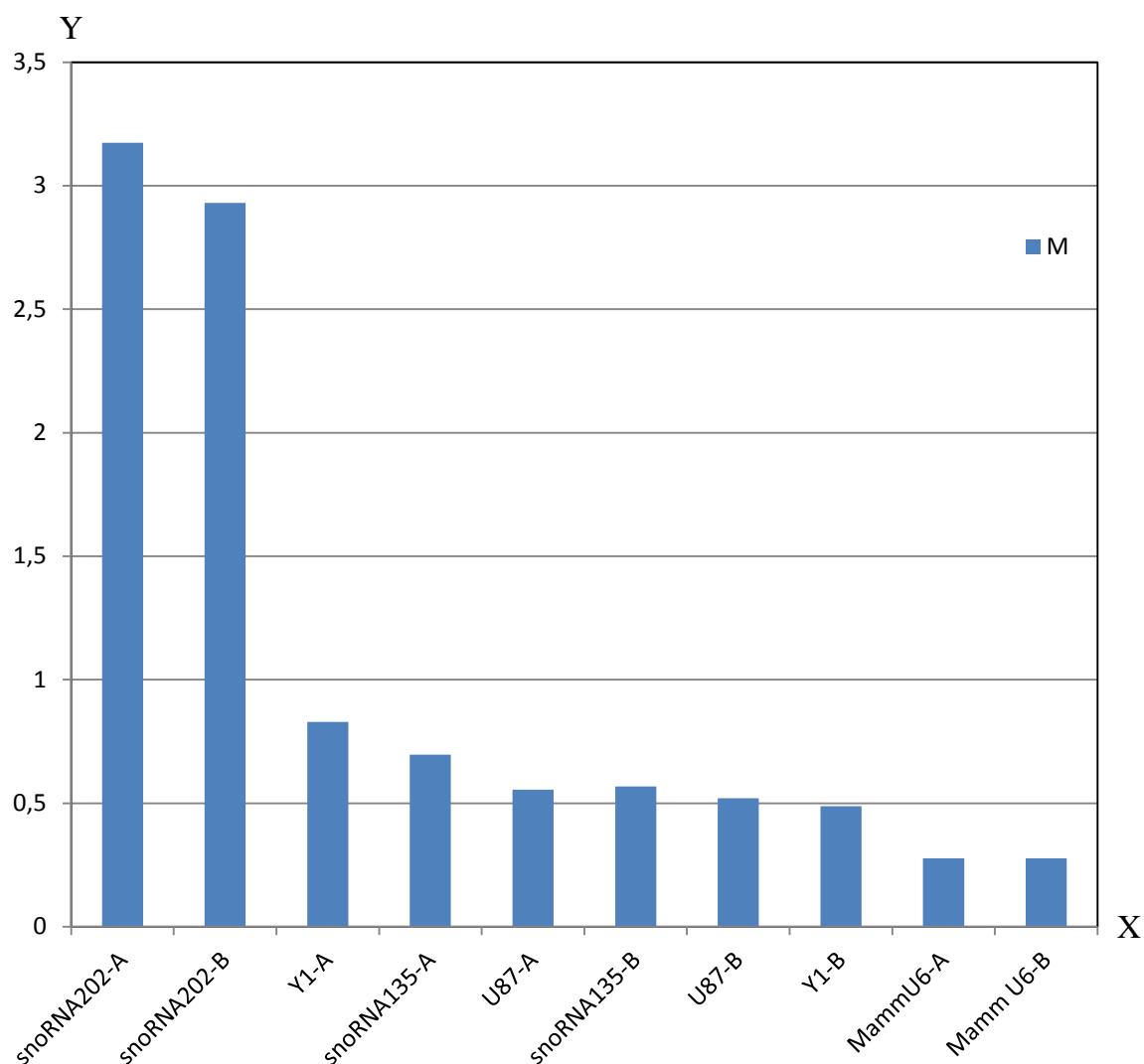


Figura 15: Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos transcritos de referência MammU6, U87, Y1, snoRNA135 e snoRNA202 nas placas A e B. O cálculo para a determinação dos melhores genes de referência após a exclusão progressiva dos genes de expressão menos estável indicando MammU6 (A e B) como os mais estáveis, com o mesmo valor de estabilidade de expressão.

O conjunto de RNAs não-codificantes de referência apropriado também foi estimado e essa análise mostrou que deveriam ser utilizados três ou quatro genes de referência. O desvio ideal entre os fatores de normalização (V) foi obtido com a utilização de três transcritos MammU6 (A e B), U87 e, a inclusão do terceiro transcrito Y1 ao grupo prévio com os dois não altera o resultado (V3/4) (Figura 16). Portanto, com a utilização de três/quatro transcritos de referência foi possível atingir o valor $V < 0,15$, como proposto por Vandesomepele *et al.*

2002²²⁰. Portanto, para a normalização dos dados, selecionamos os transcritos MammU6, U87, snoRNA135 e Y1 de ambas as placas (A+B).

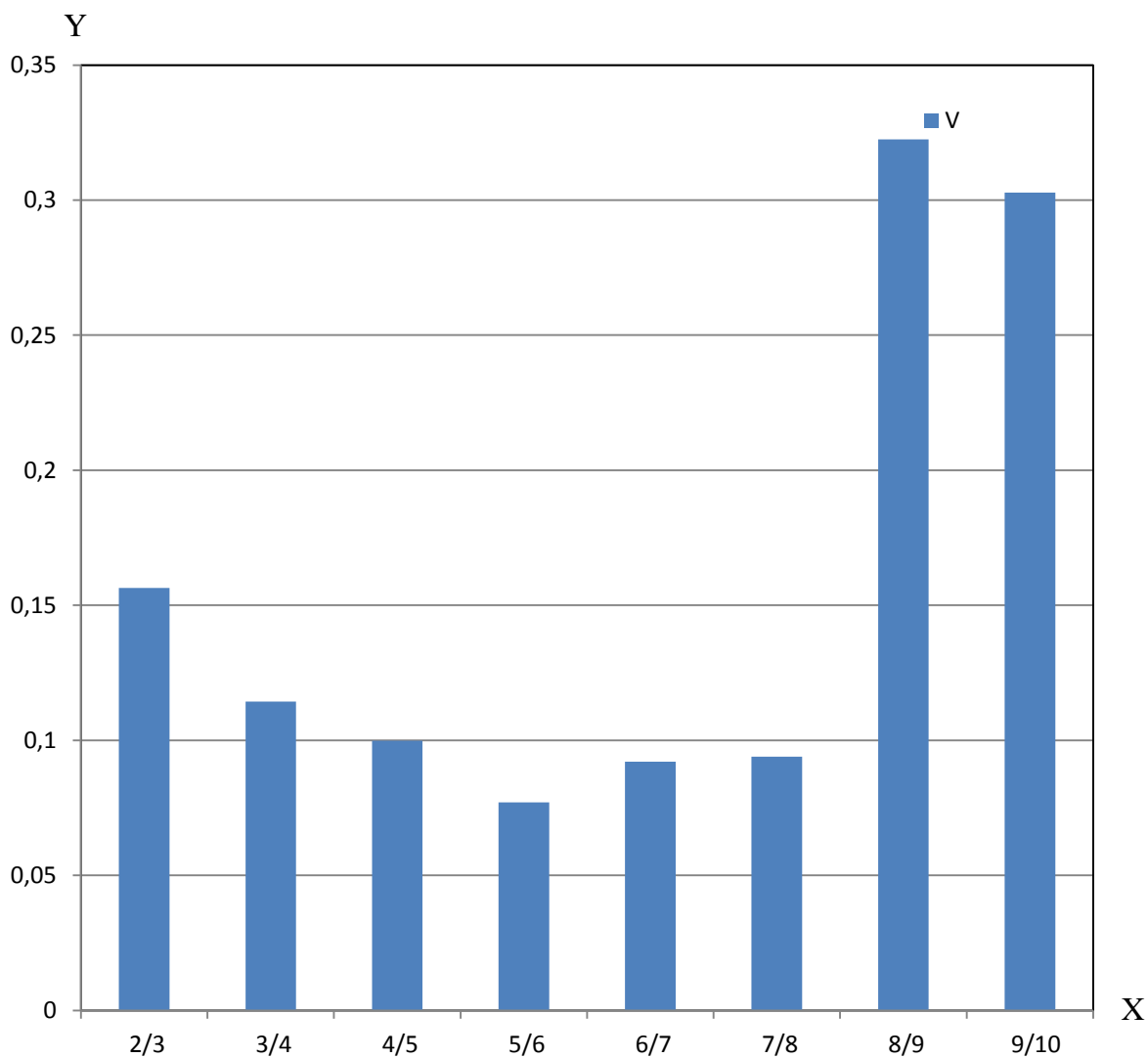


Figura 16: Determinação do número adequado de RNAs não codificantes de referência. Estimativa para o uso do número ideal de genes para a normalização, demonstrando que com o uso dos três transcritos (3/4) já se obtém a normalização ideal ($V < 0,15$).

A normalização adequada dos dados minimiza os efeitos de variações técnicas sistemáticas e é um pré-requisito para a obtenção de mudanças biológicas relevantes. Entretanto, ainda existe muita inconsistência sobre as recomendações e performances das normalizações em experimentos para a análise global da expressão de microRNAs ²²³. Portanto, além da análise da estabilidade dos cinco RNAs não-codificantes de referência (MammU6, U87, Y1, snoRNA135 e snoRNA202) presentes nas placas A e B, também realizamos uma busca pelos transcritos mais estáveis para cada uma das placas dentre todos os RNA não codificantes que apresentaram amplificação em 100% das amostras analisadas. Dessa maneira, foi possível testarmos uma normalização adicional, na qual cada placa foi considerada como um experimento individual e, posteriormente, os resultados de ambas as normalizações foram comparadas.

A busca pelos transcritos mais estáveis em cada placa foi realizada inicialmente utilizando-se o algoritmo de estabilidade do software *ExpressionSuite* v 1.0 (Life Technologies, EUA) para selecionar os 20 transcritos com maior estabilidade; posteriormente, todos os potenciais RNAs não-codificantes de referência genes foram analisados pelo *geNorm* e demonstraram coeficiente de estabilidade (M) de expressão abaixo do limiar de 1,5 sugerido por Vandesompele *et al.*, 2002 ²²⁰ (Figuras 17 e 18).

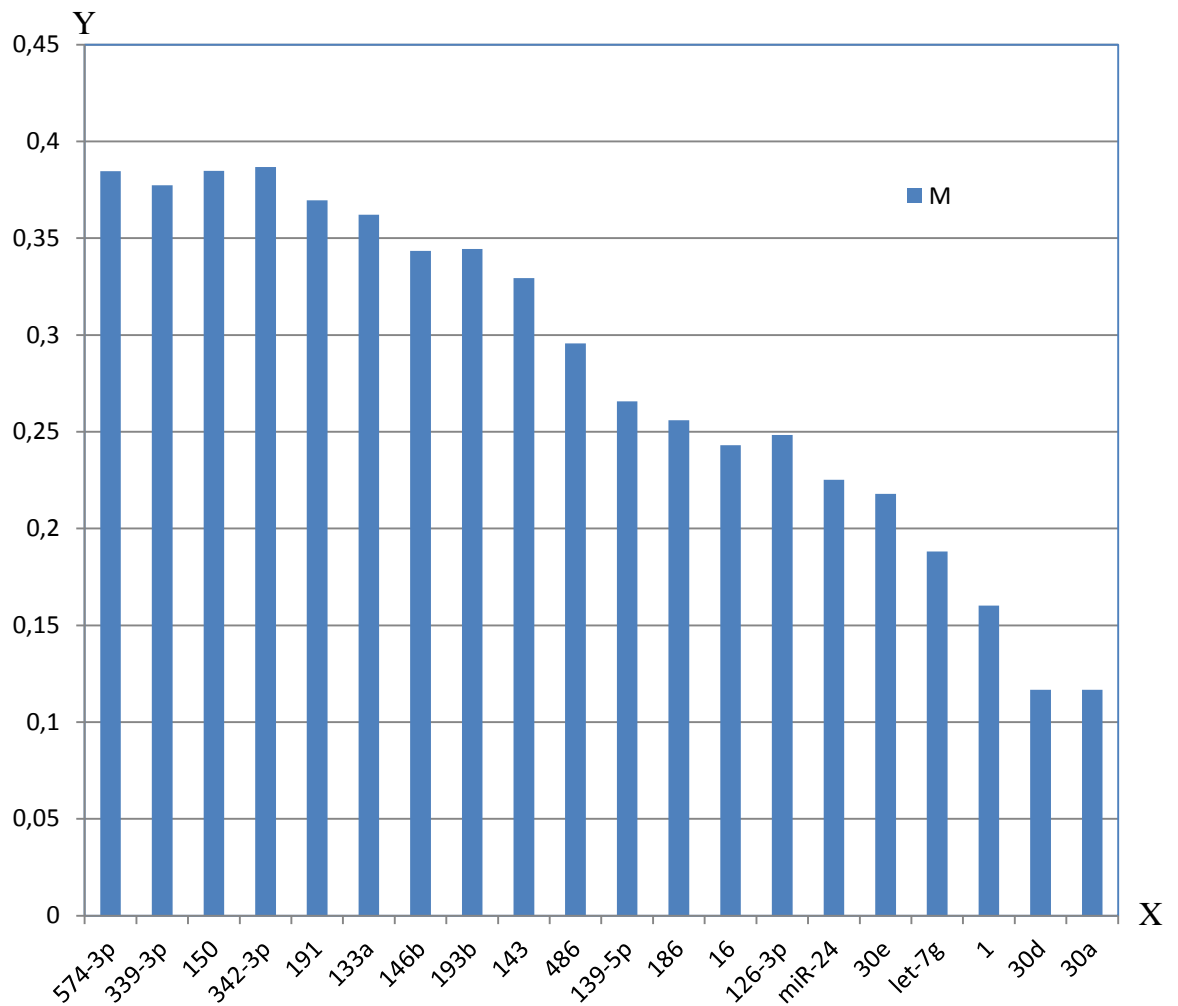


Figura 17: Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos 20 transcritos mais estáveis presentes na placa A. O cálculo para a determinação dos melhores genes de referência após a exclusão progressiva dos genes de expressão menos estável indicando os microRNAs miR-30-a e miR 30d como os mais estáveis, com o mesmo valor de estabilidade de expressão.

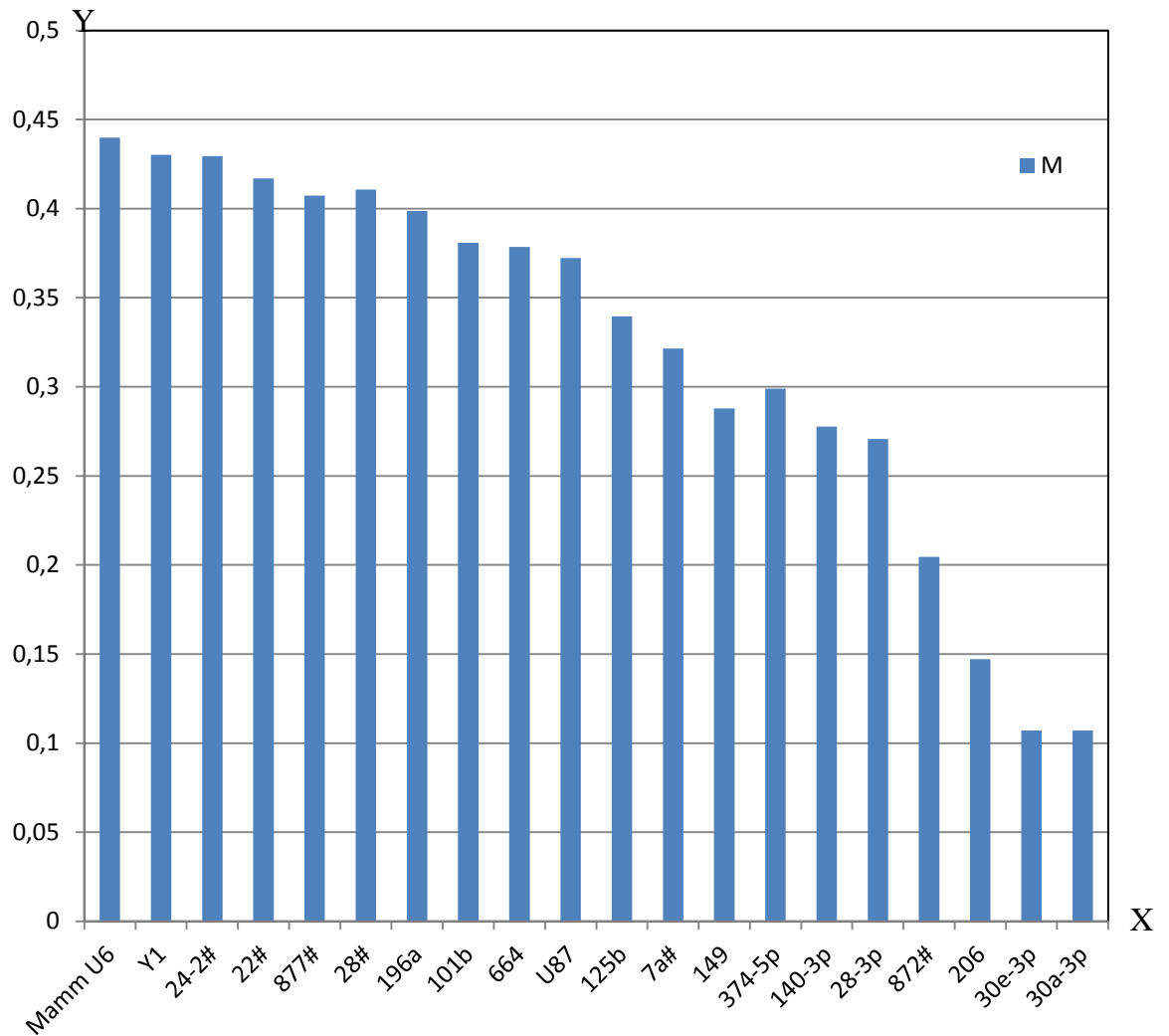


Figura 18: Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos 20 transcritos mais estáveis presentes na placa B. O cálculo para a determinação dos melhores genes de referência após a exclusão progressiva dos genes de expressão menos estável indicando os microRNAs miR-30-a-3p e miR 30e-3p como os mais estáveis, com o mesmo valor de estabilidade de expressão.

O conjunto de RNAs não-codificantes de referência apropriado também foi estimado para cada placa individualmente e essa análise mostrou que deveriam ser utilizados dois ou três genes de referência (figuras 19 e 20).

Para a placa A, o desvio ideal entre os fatores de normalização (V) foi obtido com a utilização de dois transcritos miR-30-a e miR 30d e, a inclusão do terceiro transcrito miR-1 ao grupo prévio com os dois não altera o resultado (V2/3) (Figura 12). Portanto, com a utilização de quatro/três transcritos de referência foi possível atingir o valor $V < 0,15$, como proposto por Vandesomepele *et al.* 2002²²⁰. Portanto, apenas da placa A, selecionamos os transcritos miR-30-a, miR 30d e miR-1.

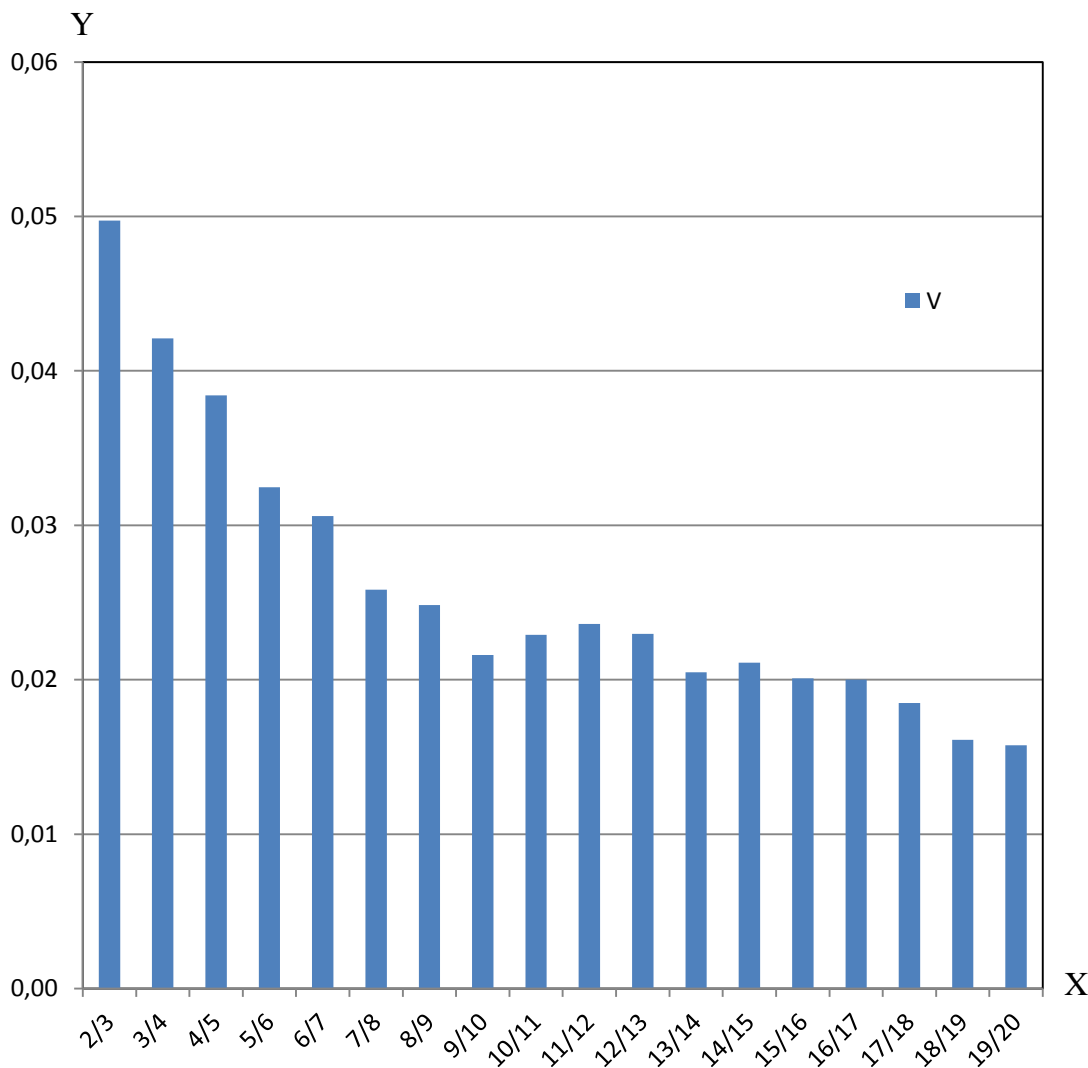


Figura 19: Determinação do número adequado de RNAs não codificantes de referência para a placa A. Estimativa para o uso do número ideal de genes para a normalização, demonstrando que com o uso dos três transcritos (2/3) já se obtém a normalização ideal ($V < 0,15$).

Para a placa B, o desvio ideal entre os fatores de normalização (V) foi obtido com a utilização de dois transcritos miR-30-a-3p e miR 30e-3p e, a inclusão do terceiro transcrito miR-206 ao grupo prévio com os dois não altera o resultado (V2/3) (Figura 20). Portanto, com a utilização de três transcritos de referência foi possível atingir o valor $V < 0,15$, como proposto por Vandesomepele *et al.* 2002²²⁰. Portanto, apenas da placa B, selecionamos os transcritos miR-30-a-3p, miR 30e-3p e miR-206.

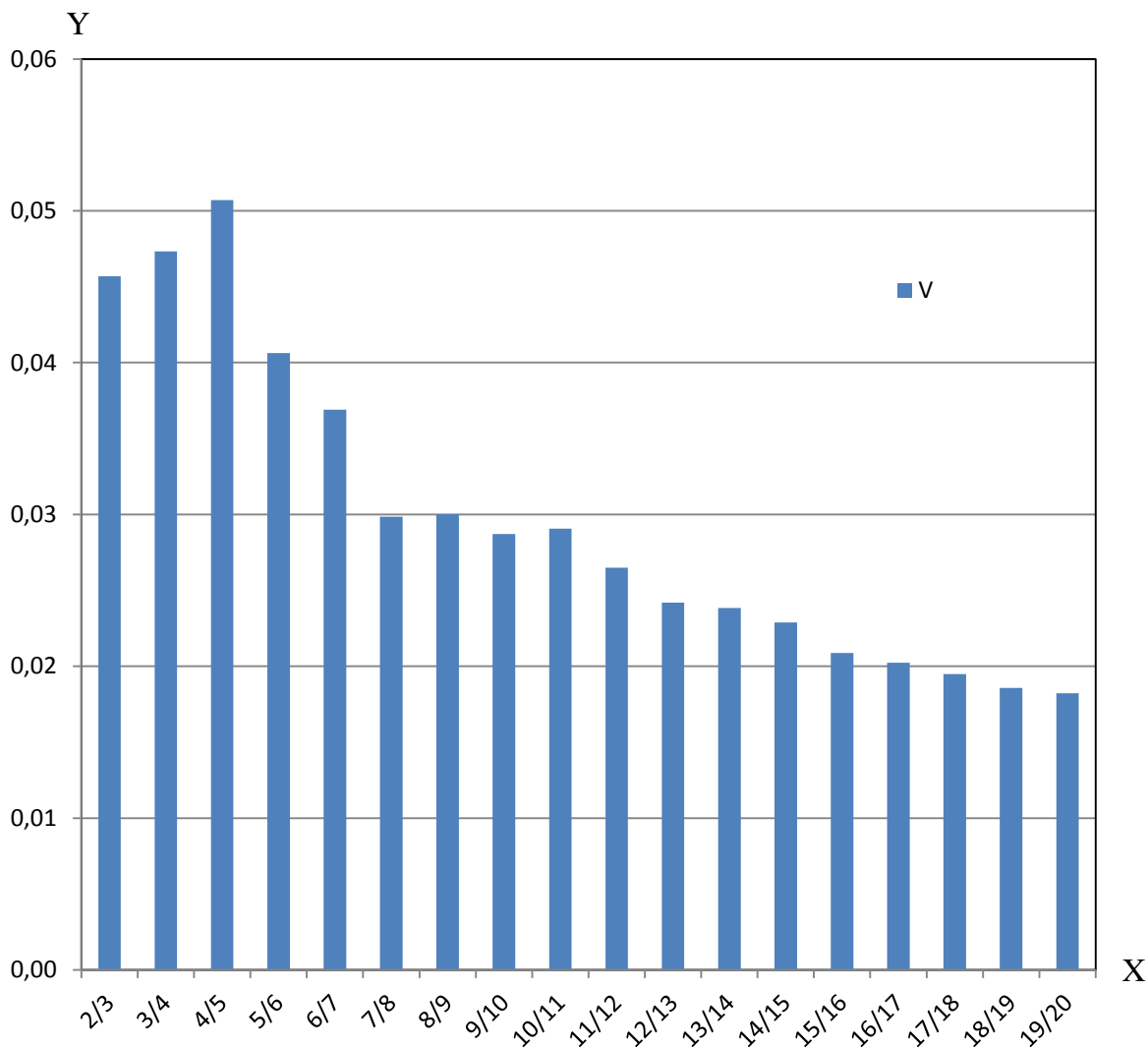


Figura 20: Determinação do número adequado de RNAs não codificantes de referência para a placa B. Estimativa para o uso do número ideal de genes para a normalização, demonstrando que com o uso dos três transcritos (2/3) já se obtém a normalização ideal ($V < 0,15$).

4.4.5. Expressão global de microRNAs na miopatia esquelética da IC

Para a análise de expressão global de microRNAs, foram inicialmente selecionados 75 miRNAs com expressão detectada em mais de 50% das amostras e 228 miRNAs detectados em todas as amostras, totalizando 303 microRNAs (tabela suplementar 1). Nessa primeira análise, os dados foram normalizados utilizando como transcritos de referência os RNA não codificantes MammU6, U87, snoRNA135 e Y1, os quais estão presentes em ambas as placas A e B. Utilizando esses parâmetros de normalização, o músculo sóleo dos animais com insuficiência cardíaca mostrou uma alteração na expressão relativa de 19 microRNAs, com diminuição na expressão de 05 microRNAs (< 50%; $P < 0,05$) e aumento na expressão de 14 microRNAs (> 150%; $P < 0,05$) quando comparado com o grupo controle (figura 21).

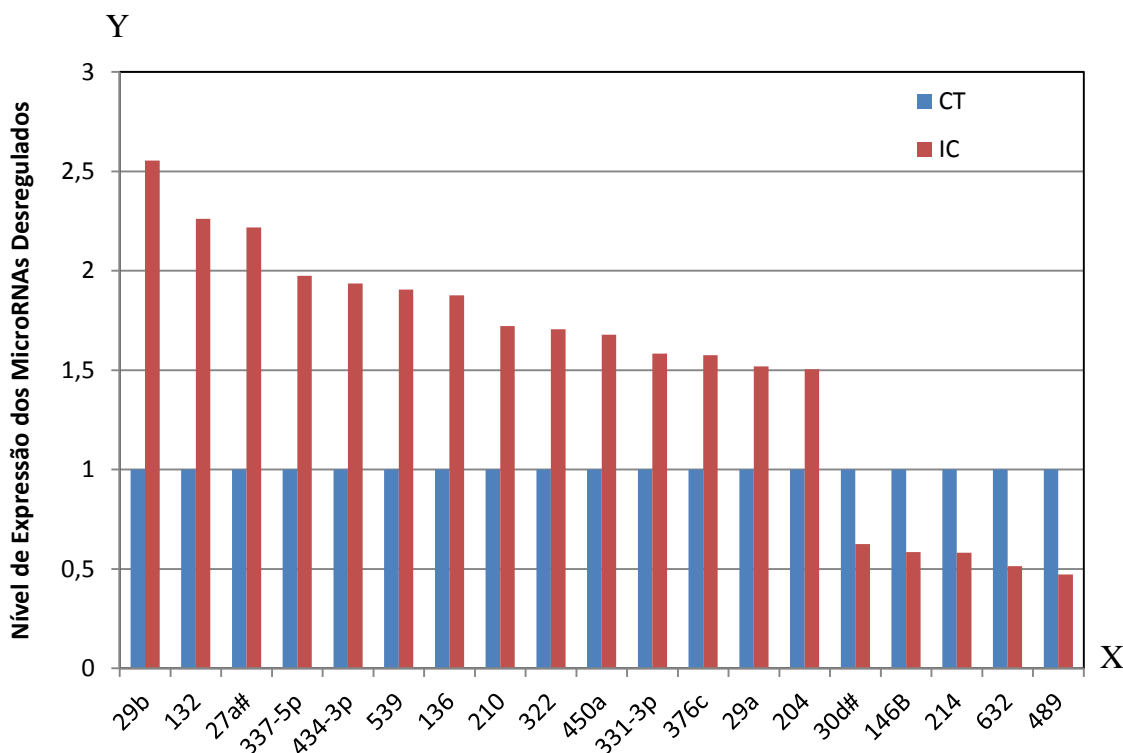


Figura 21: Expressão relativa dos microRNAs (miRs) alterados na miopatia esquelética da insuficiência cardíaca (IC) avaliados pela RT-qPCR utilizando os *TaqMan Low Density Array Rodent MicroRNA A+B Cards*. O gráfico apresenta os valores de expressão relativa do grupo IC em relação ao grupo controle (CT) e os dados estão normalizados RNA não codificantes MammU6, U87, snoRNA135 e Y1; todos os valores são estatisticamente significativos *versus* CT ($P < 0,05$).

A análise de expressão global dos 303 microRNAs também foi realizada utilizando-se os transcritos de referência mais estáveis de cada placa; miR-30-a, miR 30d e miR-1 para a placa A e miR-30-a-3p, miR 30e-3p e miR-206 para a placa B. Utilizando esses parâmetros de normalização, o músculo sóleo dos animais com insuficiência cardíaca mostrou uma alteração na expressão relativa de 24 microRNAs, com diminuição na expressão de 5 microRNAs (< 50%; $P < 0,05$) e aumento na expressão de 19 microRNAs (> 150%; $P < 0,05$) quando comparado com o grupo controle (figura 22).

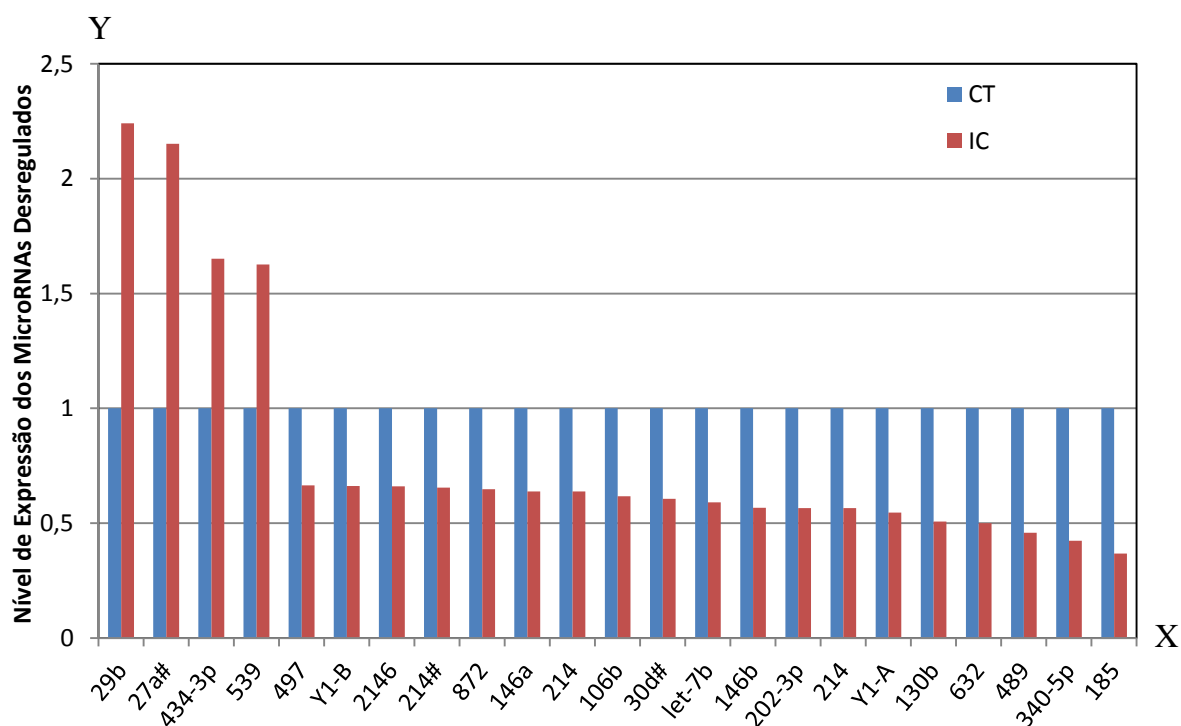


Figura 22: Expressão relativa dos microRNAs (miRs) alterados na miopatia esquelética da insuficiência cardíaca (IC) avaliados pela RT-qPCR utilizando os *TaqMan Low Density Array Rodent MicroRNA A+B Cards*. O gráfico apresenta os valores de expressão relativa do grupo IC em relação ao grupo controle (CT) e os dados estão normalizados pelos microRNAs mais estáveis do experimento, miR-30-a, miR 30d, miR-1 (placa A) e miR-30-a-3p, miR 30e-3p e miR-206 (placa B); todos os valores são estatisticamente significativos *versus* CT ($P < 0,05$).

Esses dados, em conjunto, indicam que miRNAs distintos são regulados na miopatia esquelética que ocorre na insuficiência cardíaca, sugerindo que essas moléculas possam atuar como modulares desse processo. Adicionalmente, nossos dados demonstram uma alteração no padrão de expressão de diferentes microRNAs dependente do método de normalização dos dados. Entretanto, em ambos os métodos de normalização utilizados nesse trabalho, os microRNAs miR-29b, miR-27a-5p, miR-434-3p e miR-539 apresentam um aumento de expressão; e os microRNAs miR-489, miR-214, miR-632 e miR-146b, uma diminuição de expressão. Portanto, provavelmente, esses microRNAs representem um perfil molecular para miopatia esquelética na insuficiência cardíaca. Para a elaboração do artigo científico resultante desse presente projeto, utilizaremos apenas um método de normalização.

4.4.6. Predição dos alvos de microRNAs

Inicialmente, realizamos a predição dos potenciais alvos dos miRNAs os microRNAs miR-29b, miR-27a-5p, miR-434-3p, miR-539, miR-489, miR-214, miR-632 e miR-146b, utilizando os principais algoritmos computacionais miRANDA, TargetScan e MirWalk. Atualmente existe uma grande diversidade de algoritmos computacionais que utilizam distintos parâmetros para prever sítio de ligação de um miRNA dentro de um mRNA alvo²²⁴. Cada algoritmo pode prever um número diferente de alvos para um único miRNA e, muitas vezes, esses alvos, não são co-preditos por outros programas, pois cada algoritmo leva em consideração diferentes parâmetros. Sendo assim, a utilização de mais de um algoritmo torna-se importante para expandir o número de alvos preditos bem como filtrar as buscas considerando-se como possíveis alvos aqueles mRNAs que forem preditos por diferentes algoritmos. Para isso, selecionamos previamente as seguintes ferramentas:

1. miRANDA (<http://www.microrna.org/>); utiliza uma programação dinâmica que pesquisa *locus* de alinhamento com máxima complementariedade, resultando em uma duplex antiparalela de cadeia dupla entre o miRNA e o suposto alvo. A pontuação de + 5 é atribuída para cada pareamento G:C e A:T, +2 para G:U, -3 para não pareamento, -8,0 para gap-aberto e -2,0 gap-alongamento; por fim, os alvos são listado seguindo a ordem de maior pontuação²²⁵.

2. TargetScan (<http://genes.mit.edu/tscan/targetscanS.html>); integra dados de termodinâmica, interação miRNA-mRNA e análise comparativa de seqüências para predição de alvos de miRNA²²⁶. Primeiramente o TargetScan procura pontos de ligação da sequencia *seed* (7 a 8 nucleotídeos) com o alvo, e em seguida expande o anelamento para os

nucleotídeos adicionais do miRNA. Subsequentemente calcula o valor de energia livre de ligação entre o possível alvo e o miRNA usando o RNAfold, atribuindo uma pontuação para cada UTR. Em seguida, as análises são repetidas utilizando outros organismos visando encontrar similaridade no pareamento miRNA-mRNA entre espécies²²⁷⁻²²⁹.

3. MirWalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>); abrangente base de dados que fornece informações sobre miRNA de humanos, camundongos e ratos, bem como seus sítio-alvos preditos e validados. Além disso o algoritmo prevê sítios de ligação miRNA-Alvo não apenas na região 3' UTR, mas também no promotor, 5'UTR e CDs (sequências codificantes)²³⁰.

Após a predição dos potenciais alvos utilizando as ferramentas descritas acima, os alvos preditos foram confrontados com os dados da literatura para correlacionar os resultados dos miRNAs com as vias e funções biológicas dos genes alvos desses miRNAs utilizando o e o MirWalk²³⁰. Essas ferramenta é formada por dois componentes: *i*) Alvos validados, base de dados que contém alvos de miRNA experimentalmente validados resultantes de uma curadoria meticulosa da literatura; *ii*) Alvos preditos, que é uma integração de alvos de miRNA preditos por até 11 programas de predição de alvos de miRNAs (DIANA-microT, MicroInspector, Miranda, MirTarget2, miTarget, NBmiRTar, PicTar, PITA, RNA22, RNAhybrid, TargetScan/TargertScanS)²³¹ e MirMalk²³⁰.

Foram identificados alvos já validados no contexto músculo esquelético para os miRNAs: miR-27a, miR-29b, miR-214, miR-489, miR-632 e miR-146b, para o miR-539 não obtivemos êxito, os alvos são apresentados na Tabela Suplementar 2. Em relação aos alvos preditos, foram considerados aqueles preditos por pelo menos quatro algoritmos diferentes e que seu alvo seja expresso no contexto do músculo esquelético. Os dados são apresentados na Tabela Suplementar 3.

4.4.7. Expressão proteica de TNF- α e NF-K β

Os resultados para a expressão das proteínas estudadas pelo Western Blotting mostraram que houve aumento da expressão das proteínas NF-K β e TNF- α MAFbx no grupo IC em relação ao grupo CT (figura 23).

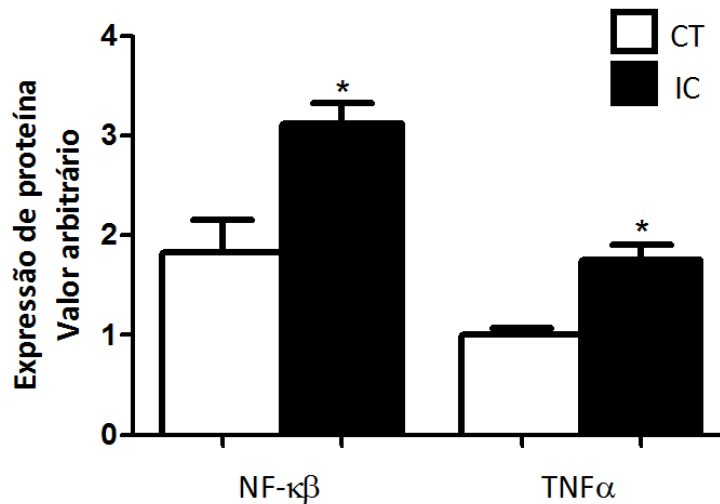


Figura 23: Expressão relativa das proteínas NF-KB (Rel A (p65)) e TNF- α no músculo sóleo dos animais dos grupos controle (CT) e insuficiência cardíaca (IC) analisada por Western blotting. Os dados foram normalizados pela expressão da beta actina e são expressos como média \pm desvio padrão. Os valores de P foram obtidos pelo teste *t-Student*. * P<0,05: estatisticamente significante *versus* grupo controle.

5. DISCUSSÃO

Os micro-RNAs (miRNAs) possuem um papel fundamental na modulação de muitos processos biológicos no desenvolvimento, diferenciação, crescimento e metabolismo e em diversas doenças. Os resultados do presente estudo permitiram a identificação de um conjunto de microRNAs que encontram-se alterados na miopatia esquelética de ratos com insuficiência cardíaca e que provavelmente possuem uma importante implicação nas alterações celulares e moleculares do músculo esquelético que ocorrem nessa síndrome.

A prevalência de insuficiência cardíaca (IC) está entre 2 e 3 % da população ocidental e aumenta consideravelmente em pessoas de 70-80 anos de idade, perfazendo entre 10% e 20% da população ^{1,5}. A incidência de IC acendeu mais de 150% nas duas últimas décadas e o número de pacientes com essa síndrome continua aumentando em função do desenvolvimento farmacológico, terapêutico, de técnicas e estratégias cirúrgicas que melhoram a sobrevivência após infarto agudo do miocárdio e outras condições cardiovasculares ⁷.

Grande parte dos esforços no estudo de doenças cardiovasculares está focadas no ventrículo esquerdo, contudo essa perspectiva toma rumo adicional quando observamos que aproximadamente 30% dos casos de IC estão relacionados à falência do ventrículo direito (VD), e que a causa predominante de âmbito pós-transplante cardíaco é em função da insuficiência do VD ⁸. A elucidação de novas vias fisiopatológicas pode trazer novas contribuições terapêuticas e melhora do prognóstico para os pacientes acometidos de IC. Deste modo, protocolos experimentais que mimetizem a insuficiência ventricular direita também são extremamente relevantes para compreensão dos mecanismos que envolvem instalação dessa cardiopatia.

O alcaloide vegetal monocrotalina (MCT) tem sido empregado como modelo padrão de desenvolvimento de hipertensão pulmonar, de hipertrofia e insuficiência cardíaca direita em diversos trabalhos publicados ^{62,64,232,233}. Uma vez na circulação, a dihidromonocrotalina (metabólito hepático ativo da MCT) causa proliferação de artérias pulmonares de pequeno calibre (hipertrofia medial), comprometendo o fluxo sanguíneo com consequente hipertensão pulmonar. Este quadro leva ao desenvolvimento de hipertrofia compensatória do ventrículo direito e progressivo desenvolvimento de IC ^{62,211}. Este modelo é eficaz em reproduzir parâmetros funcionais e bioquímicos similares aos de humanos, tais como aumento nos níveis do peptídeo natriurético atrial, aumento nas concentrações de endotelina e hiperatividade do sistema renina-angiotensina, sendo deste modo um modelo útil para compreensão da IC. O

modelo da monocrotalina também é importante para o estudo da miopatia esquelética que ocorre na IC, principalmente para a compreensão dos processos responsáveis pela atrofia e mudanças nos tipos de fibras musculares⁵⁷⁻⁶¹. Essas alterações morfofisiológicas do músculo esquelético se desenvolvem semelhantemente em modelos de IC do ventrículo direito e do esquerdo^{60-62,64,67,234}.

A atrofia das fibras musculares na IC tem sido comumente observada tanto em estudos clínicos^{58,59,68,70,74}, como em trabalhos experimentais^{61,235-239}. No entanto, a atrofia parece ser dependente do modelo utilizado bem como do tipo de músculo analisado. Em trabalhos no nosso grupo, observamos que no modelo de IC induzida pela monocrotalina, o músculo EDL apresentou atrofia²³⁸; entretanto, não observamos atrofia dos músculos sóleo⁶³ e diafragma⁶⁵. Entretanto, o músculo sóleo apresenta atrofia nos modelos de insuficiência cardíaca induzida por estenose aórtica⁶¹, infarto do miocárdio²⁴⁰ e em ratos espontaneamente hipertensos²⁴¹. No presente trabalho, na tentativa de acentuar as alterações musculares na IC no modelo da monocrotalina, utilizamos uma maior dose da droga em animais com maior peso corpóreo inicial, seguindo o protocolo descrito por Gary-Bobo *et al.*, 2010²³³. Essa modificação prolongou o tempo de nosso experimento para 30 dias e o músculo sóleo apresentou redução na área das fibras do tipo I, IIa e Ic/IIc no grupo IC comparado ao grupos CT. Alguns fatores parecem estar envolvidos na atrofia muscular, como redução da atividade física e neuromuscular, ativação sistêmica de neurohormônios e citocinas inflamatórias que acompanham o desenvolvimento da insuficiência cardíaca^{242,243}.

Tem sido demonstrado que a atrofia da musculatura esquelética na insuficiência cardíaca pode ser induzida pelo fator de necrose tumoral (TNF- α)^{70,244-248}, citocina envolvida com a ativação o sistema proteossomal dependente de ubiquitina (PDU) pelas vias do p38 e do fator nuclear Kappa NF- κ B²⁴⁹. Essa ativação resulta em um aumento da expressão dos fatores atrogênicos MuRF1 e MAFbx^{249,250}, e consequente proteólise de cadeia pesada de miosinas (MyHC)²⁴⁹.

No nosso estudo, os animais do grupo IC apresentaram um aumento da expressão gênica e uma diminuição da expressão proteica do TNF- α . Como na IC, os níveis plasmáticos de TNF- α , bem como de seus receptores solúveis encontram-se elevados^{247,248,251,252} é provável que uma ação sistêmica e não uma síntese local de TNF- α seja responsável pela atrofia muscular em nosso modelo experimental. De fato, como já demonstrado por Steffen *et al.*, 2008²³⁷, o tratamento anti-TNF reduz a perda de massa muscular em ratos com insuficiência cardíaca induzida pela monocrotalina. Esse aumento da expressão proteica de

TNF- α que identificamos nos animais com IC é acompanhado de um aumento da expressão proteica de NF- κ B. Consistente ainda com esses resultados, a expressão dos fatores atrogênicos MuRF1 e MAFbx no músculo sóleo também foi maior no grupo IC em relação ao grupo controle. A expressão de MuRF1 e MAFbx é estimulada em diversos modelos distintos de atrofia muscular^{246,253-255}, incluindo a atrofia do músculo EDL de ratos com insuficiência cardíaca induzida pela monocrotalina²³⁸. No presente estudo, também analisamos a expressão gênica de componentes de vias proteolíticas do músculo esquelético, considerados como marcadores do processo de atrofia; houve um aumento da expressão de Runx1 e Ctss sem alteração de Capn2. Portanto, esses resultados, em conjunto, mostram que a atrofia do músculo sóleo na insuficiência cardíaca induzida pela monocrotalina é mediada, em parte, pela ativação do sistema proteossomal dependente de ubiquitina.

Outra importante alteração do músculo esquelético na insuficiência cardíaca é a mudança na composição das isoformas da miosina de cadeia pesada, com diminuição na proporção das fibras do tipo I, de contração lenta, e aumento na proporção das fibras do tipo II, de contração rápida^{56,58,62}. Dados do nosso grupo de pesquisa, obtidos em ratos com insuficiência cardíaca induzida por monocrotalina^{63,65,238}, estenose aórtica⁶¹, infarto do miocárdio²⁴⁰ e em ratos espontaneamente hipertensos²⁴¹, também demonstraram essa mudança na proporção dos tipos de fibras. Além dessas alterações já descritas, também identificamos no presente estudo uma diminuição da expressão do gene *Tnni1*, utilizado para caracterizar fibras lentas²⁵⁶; entretanto, não detectamos alteração na expressão do gene *Myh7b* de fibras lentas, e dos genes *Tnni2* e *Tnni3* de fibras rápidas, os quais também são utilizados como marcadores moleculares dos tipos de fibras musculares²⁵⁶.

A miopatia do músculo sóleo, com perda da massa muscular e a mudança na composição das isoformas da miosina de cadeia pesada, nos animais com IC induzida pela monocrotalina, é particularmente interessante para a identificação de genes e vias de sinalização celular envolvidas nesses processos. Como os microRNAs possuem um importante papel na modulação do fenótipo celular, realizamos uma análise de expressão global dessas moléculas para identificar um possível envolvimento nas alterações transcricionais e translacionais na expressão gênica que ocorrem na miopatia esquelética da IC. Para o nosso conhecimento não há relatos em literatura de alterações envolvendo miRNAs miopatia esquelética da IC. Nossos dados mostram que os miRNAs miR-29b, miR-27a-5p, miR-434-3p, miR-539, miR-489, miR-214, miR-632 e miR-146b são regulados na miopatia esquelética que ocorre na insuficiência cardíaca, sugerindo que essas moléculas possam atuar

como modulares desse processo. Posteriormente, realizamos uma busca na literatura e utilizamos algoritmos de predição (*TargetScan*, *miRANDA* e *MirWalk*) para definir os RNAs mensageiros alvos desses miRs.

As estratégias de predição de alvo baseia-se essencialmente em algoritmos de alinhamento de sequências para identificar sítios complementares entre a região 3' UTR e a sequência *seed* do miRNA²²⁴. A sequência *seed* é definida como a sequência de sete a oito nucleotídeos consecutivos contados a partir do primeiro ou segundo nucleotídeo da extremidade 5' de um miRNA²²⁹. Contudo, as evidências sugerem que o anelamento perfeito da região *seed* pode não ser necessariamente um indicador confiável para interações miRNA-alvo, o que pode explicar por que alguns sítios alvos previstos são não-funcionais²²⁹.

Os primeiros estudos com miRNAs e seus respectivos alvos se baseavam unicamente em experimentos laboratoriais, de modo que os primeiros foram identificados por meio de técnicas de genética clássica²⁵⁷. Devido ao caráter árduo dos experimentos laboratoriais e ao seu baixo rendimento, novas estratégias de estudos foram desenvolvidas, como a utilização da bioinformática²²⁶. Atualmente, as abordagens computacionais tem sido uma ferramenta valiosa na identificação e compreensão do papel biológico desses RNAs, tornando-se a força motriz na predição de alvos^{258,259}, na expansão dos bancos de dados com novas sequências, e também na identificação *in silico* de novos possíveis miRNAs²²⁶.

A predição e validação biológica de alvos têm sido um dos principais obstáculos para os pesquisadores de miRNAs em vertebrados, pois além desses miRNAs serem mais curtos em relação a outros organismos, eles também apresentam complementaridade da sequência parcial o que dificulta a predição de alvos com precisão²²⁶. Nesse contexto, o desenvolvimento de algoritmos computacionais que identifiquem genes alvos de miRNAs depende de dados como, padrão de pareamento de bases miRNA-mRNA, estabilidade termodinâmica do híbrido miRNA-mRNA, análise comparativa das sequências para verificar a conservação entre espécies e avaliar se há presença de sítios com múltiplos alvos²²⁴. Entretanto, não há atualmente um consenso claro entre os critérios que devem ser seguidos para determinar os possíveis alvos de um miRNA²²⁴.

Evidências sugerem que o alinhamento perfeito da sequência *seed* com o mRNA não é necessariamente um indicador decisivo para a real interação miRNA-mRNA²⁶⁰. Nesse sentido, o primeiro passo na identificação de alvos é o padrão de anelamento. Esse padrão pode ser classificado em três grupos²⁶¹: (i) *5'-dominant canonical*, consiste no pareamento perfeito da região *seed* com a região final 3' e com uma protuberância central característica,

(ii) *5'-dominant seed only*, apresenta pareamento perfeito da região *seed* e imperfeito da região 3' e (iii) *3'-compensatory*, consiste no pareamento imperfeito na região *seed* mas com alinhamento de bases compensatório ao longo da região 3' ²⁶².

Além disso, os parâmetros termodinâmicos também devem ser levados em consideração, onde a duplex miRNA-mRNA é avaliada quanto à energia livre (ΔG) da ligação; quanto menor a energia livre de hibridização, maior a chance do miRNA se ligar ao alvo predito. Contudo, isso não garante uma ligação suficientemente forte do miRNA ao seu alvo ²⁶³; por esse motivo, existe uma dificuldade para padronização de um limiar de energia livre que seja satisfatório para diferentes híbridos miRNA-mRNA, sendo assim, é fundamental considerar características adicionais na predição de alvos de miRNAs ²²⁶.

Dentre essas características adicionais, podemos destacar: i) análise comparativa de sequências entre espécies relacionadas para verificar se as sequências alvos são evolutivamente conservadas, aumentando a chance de o mRNA predito ser realmente alvo de um determinado miRNA ²⁶³. Portanto, alguns algoritmos de predição identificam sequências ortólogas à região UTR e, em seguida, analisa a conservação entre espécies relacionadas ²⁶³; ii) análise de miRNAs co-expressos que podem regular um mesmo gene alvo ²⁵⁹ ou a presença de múltiplos sítios alvos em um mesmo UTR, os quais podem potencializar o grau de supressão de um transcrito e aumentar a especificidade de sua regulação. Nesse contexto, alguns algoritmos verificam a existência de sítios com múltiplos alvos e consideram esses dados durante a predição de alvos ²⁶⁴.

Como a combinação de vários algoritmos de predição de alvos dos microRNAs fornecem um grande número de alvos preditos, geralmente com funções bastante distintas, os grande desafio é a identificação de quais são os mais importantes para a investigação ²⁶⁵. Em alguns casos, as propriedades conhecidas de um alvo predito sugerirão qual processo biológico de interesse pode ser particularmente sensível à mudança de expressão de um determinado microRNA, tornando esse alvo particularmente promissor para investigação; nessa linha de estudos, vários experimentos já identificaram interações regulatórias de diversos microRNAs. Com o auxílio de predições de alvos, dados de expressão e conhecimento biológico, os candidatos para interação são identificados focando nas mensagens celulares preditas como mais responsivas ao miRNA, co-expressas com o miRNA em células relevantes, em nodos vulneráveis e interessantes de vias regulatórias ²⁶⁵.

Após a análise da predição dos alvos utilizando os algoritmos miRANDA, TargetScan e MirWalk e a busca por microRNAs com algumas funções biológicas já estabelecidas no

tecido muscular, selecionamos os microRNAs miR-29b, miR-214 e miR-489, que se destacam no nosso estudo dentre os microRNAs com maior nível de alteração. Wang *et al.*, 2008²⁰² já descreveram a regulação do miR-29b na miogênese e no rabdomiosarcoma; esses autores demonstraram que o miR-29b é reprimido pelo eixo de sinalização NF-κB–Yin Yang1 (YY1)-miR-29. O NF-κB é um dímero, sendo o dímero p65/p50 sua forma mais comum²⁶⁶ e em células em repouso encontra-se normalmente inativo no citoplasma através da associação com a proteína IκB²⁶⁷. A exposição do TNF-α ao seu receptor na membrana plasmática leva à fosforilação da IκB pelo complexo quinase IκB (IKK) e a proteína IκB é então ubiquitinizada para posterior degradação proteossomal²⁶⁸. A degradação da IκB permite a ativação e a translocação de heterodímeros de NF-κB para o núcleo celular com subsequente expressão de genes alvo²⁶⁹. Sob a ativação do NF-κB, o fator transcricional YY1 reprime a diferenciação muscular pelo silenciamento epigenético do miR-29 recrutando a histona metil-transferase Ezh2 bem como a histona deacetilase 1^{202,270}.

Como já discutido anteriormente, os níveis plasmáticos de TNF-α, bem como de seus receptores solúveis encontram-se elevados^{247,248,251,252} na IC e, embora não tenhamos dosado os níveis de TNF-α circulante, o aumento de TNF-α no músculo dos animais com IC pode ter induzido o aumento da expressão da subunidade p65 do NF-κB e a consequente atrofia muscular do músculo esquelético em nosso modelo de IC. Adicionalmente, a atividade do NF-κB parece regular a perda de massa muscular em outras formas de atrofia muscular^{250,271–274} e a sua inibição *in vitro* reverte o processo de atrofia²⁷⁵. Entretanto, verificamos no presente estudo que o aumento da expressão da subunidade p65 do NF-κB não inibiu a expressão do miR-29b o qual, contrariamente, apresenta o maior aumento de expressão dentre todos os microRNAs analisados nos músculo dos animais com IC. Entretanto, já foi descrito em literatura que, na miogênese, os níveis do miR-29 também encontram-se elevados pela substituição do complexo repressivo YY1/Ezh2/HDAC1 pelo complexo ativador MyoD/SRF na região promotora desse microRNA; esse aumento na expressão do miR-29 também induz a diminuição da expressão de YY1, o qual é um alvo desse microRNA^{202,270,276}.

Outro importante resultado do presente estudo é a diminuição da expressão do miR-214 no músculo dos animais com IC, pois esse microRNA possui como alvo a região 3' UTR da Ezh2 e o aumento de sua expressão já foi descrito como responsável pela redução da proteína Ezh2 com consequente aceleração do diferenciação de células musculares esqueléticas²⁷⁷. Provavelmente, esses dados para do miR-214 também possuam uma correlação com a diminuição da expressão do miR-489 no músculo dos animais com IC em nosso estudo; o

miR-489 foi descrito recentemente como responsável pela manutenção da quiescência de células tronco musculares reprimindo pós-transcricionalmente o oncogene Dek, cuja proteína se localiza em células filhas mais diferenciadas após a divisão assimétrica de células satélites e promove a expansão proliferativa de progenitores miogênicos²⁷⁸.

Em resumo, as alterações na expressão dos microRNAs miR-29 e miR-214 já nos fornecem valiosas informações sobre importantes vias de células musculares esqueléticas, como a NF- κ B–YY1-miR-29 e a regulação da proteína Ezh2 pelo miR-214, que provavelmente encontram-se desreguladas na atrofia muscular que ocorre na IC. Portanto, para melhor compreender o papel desses microRNAs, estamos atualmente realizando as análises de expressão gênica e/ou proteica para avaliar a MyoD, Ezh2 e YY1 e, assim finalizar os experimentos que, em conjunto com os dados do projeto mestrado vinculado (FAPESP, processo n° 2011/03004-1), serão utilizados para gerar a publicação do presente projeto.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Pretendemos avaliar os demais microRNAs com expressão alterada na miopatia esquelética da insuficiência cardíaca para identificarmos outras possíveis vias celulares que também possam contribuir para o desenvolvimento das alterações musculares. Previamente identificamos correlação dos microRNAs alterados com as vias de apoptose, IGF1/mTOR, Nfat, U calpaína e via do AKT, resultados obtidos com base em dados de alvos microRNAs validados.

A predição de alvos de microRNAs com precisão tem se mostrado um trabalho árduo, uma vez que mesmo utilizando os algoritmos mais citados na literatura ainda temos uma incongruência dos dados, pois alvos de um microRNA já validado não são, muitas vezes, preditos por esses algoritmos. Contudo, após elencado os principais alvos preditos iremos confeccionar primers para verificar se houve modulação na expressão no transcrito desses possíveis alvos.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Jessup, M. & Brozena, S. Heart failure. *The New England journal of medicine* **348**, 2007–18 (2003).
2. Hunt, S. A. *et al.* ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guideli. *Circulation* **112**, e154–235 (2005).
3. Katz, A. M. & Konstam, M. A. *Heart failure : pathophysiology, molecular biology, and clinical management*. 335 (Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: 2009).
4. Seixas-Cambão, M. & Leite-Moreira, A. F. Fisiopatologia da Insuficiência Cardíaca Crônica. *rev Port Cardiol* **24**, 439–471 (2009).
5. Paulus, W. J. *et al.* How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *European heart journal* **28**, 2539–50 (2007).
6. Dickstein, K. *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart. *European heart journal* **29**, 2388–442 (2008).
7. Liew, C.-C. & Dzau, V. J. Molecular genetics and genomics of heart failure. *Nature reviews. Genetics* **5**, 811–25 (2004).
8. Levett, J. M. & Karp, R. B. Heart transplantation. *The Surgical clinics of North America* **65**, 613–35 (1985).
9. Albanesi Filho, F. M. [What is the current scenario for heart failure in Brazil?]. *Arquivos brasileiros de cardiologia* **85**, 155–6 (2005).
10. Laboratories, E. P. & Management, L. Cardiovascular Response to Punching Tempo. *Strength And Conditioning* **17**, 104–108 (2003).
11. Dickstein, K. *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart. *European heart journal* **29**, 2388–442 (2008).
12. Norton, G. R. *et al.* Heart Failure in Pressure Overload Hypertrophy. *Journal of the American College of Cardiology* (2007).
13. Lopes, A. C. *Tratado de Clínica Médica*. 5504 (2009).

14. Triposkiadis, F. *et al.* The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *Journal of the American College of Cardiology* **54**, 1747–62 (2009).
15. Ventura-Clapier, R., Garnier, A. & Veksler, V. Energy metabolism in heart failure. *The Journal of physiology* **555**, 1–13 (2004).
16. Jessup, M. & Brozena, S. Heart failure. *The New England journal of medicine* **348**, 2007–18 (2003).
17. Liggett, S. B. Pharmacogenomics of beta1-adrenergic receptor polymorphisms in heart failure. *Heart failure clinics* **6**, 27–33 (2010).
18. Lecour, S. & James, R. W. When are pro-inflammatory cytokines SAFE in heart failure? *European heart journal* **32**, 680–5 (2011).
19. Mazhar, R. Possible role of juxtaglomerular apparatus in low cardiac output syndrome and multiple organ failure: modulation by high sodium load. *Medical hypotheses* **57**, 128–30 (2001).
20. Rosenbaugh, E. G., Savalia, K. K. & Zimmerman, M. C. Antioxidant-Based Therapies for Angiotensin II-Associated Cardiovascular Diseases. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* (2013).doi:10.1152/ajpregu.00395.2012
21. Chaney, E. & Shaw, A. Pathophysiology of fluid retention in heart failure. *Contributions to nephrology* **164**, 46–53 (2010).
22. Teerlink, J. R. Reversal of left ventricular remodeling: role of the endothelin pathway. *Journal of cardiac failure* **8**, S494–9 (2002).
23. Dickhout, J. G., Carlisle, R. E. & Austin, R. C. Interrelationship between cardiac hypertrophy, heart failure, and chronic kidney disease: endoplasmic reticulum stress as a mediator of pathogenesis. *Circulation research* **108**, 629–42 (2011).
24. Takai, S., Jin, D. & Miyazaki, M. New approaches to blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system: chymase as an important target to prevent organ damage. *Journal of pharmacological sciences* **113**, 301–9 (2010).
25. Collier, P. & McDonald, K. M. The role of renin angiotensin system intervention in stage B heart failure. *Heart failure clinics* **8**, 225–36 (2012).
26. Liu, C., Chen, J., Gao, Y., Deng, B. & Liu, K. Endothelin receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension. *Cochrane database of systematic reviews (Online)* **2**, CD004434 (2013).
27. Costello-Boerrigter, L. C., Boerrigter, G. & Burnett, J. C. Pharmacology of vasopressin antagonists. *Heart failure reviews* **14**, 75–82 (2009).

28. Palazzuoli, A. & Ronco, C. Cardio-renal syndrome: an entity cardiologists and nephrologists should be dealing with collegially. *Heart failure reviews* **16**, 503–8 (2011).
29. Lanfear, D. E. *et al.* Association of arginine vasopressin levels with outcomes and the effect of V2 blockade in patients hospitalized for heart failure with reduced ejection fraction: insights from the EVEREST trial. *Circulation. Heart failure* **6**, 47–52 (2013).
30. Gombos, T. *et al.* Complement anaphylatoxin C3a as a novel independent prognostic marker in heart failure. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* **101**, 607–15 (2012).
31. Torre-Amione, G. Immune activation in chronic heart failure. *The American journal of cardiology* **95**, 3C–8C; discussion 38C–40C (2005).
32. Osmancik, P. *et al.* Changes and prognostic impact of apoptotic and inflammatory cytokines in patients treated with cardiac resynchronization therapy. *Cardiology* **124**, 190–8 (2013).
33. Burger, A. J. A review of the renal and neurohormonal effects of B-type natriuretic peptide. *Congestive heart failure (Greenwich, Conn.)* **11**, 30–8
34. Januzzi, J. L. Natriuretic peptides, ejection fraction, and prognosis: parsing the phenotypes of heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* **61**, 1507–9 (2013).
35. Nakagawa, O. *et al.* Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy. Evidence for brain natriuretic peptide as an “emergency” cardiac hormone against ventricular overload. *The Journal of clinical investigation* **96**, 1280–7 (1995).
36. Milo-Cotter, O. *et al.* Neurohormonal activation in acute heart failure: results from VERITAS. *Cardiology* **119**, 96–105 (2011).
37. Sadoshima, J. & Izumo, S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annual review of physiology* **59**, 551–71 (1997).
38. Hunter, J. J. & Chien, K. R. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *The New England journal of medicine* **341**, 1276–83 (1999).
39. Chien, K. R. Meeting Koch’s postulates for calcium signaling in cardiac hypertrophy. *The Journal of clinical investigation* **105**, 1339–42 (2000).
40. Gonçalves, L. M. Mecanismos Fisiopatológicos da Remodelagem Ventricular. *Rev. Port. Cardiol.* **23**, 41–46 (2004).
41. Bueno, O. F. & Molkenkin, J. D. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circulation research* **91**, 776–81 (2002).

42. Castro-Chaves, P. & Leite-Moreira, A. F. Sistema Renina Angiotensina e seu Papel na Fisiopatologia e Terapêutica Cardiovascular. *Rev. Port. Cardiol.* **23**, 61–77 (2004).
43. Touyz, R. M. & Schiffrin, E. L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological reviews* **52**, 639–72 (2000).
44. Towbin, J. A. Scarring in the heart--a reversible phenomenon? *The New England journal of medicine* **357**, 1767–8 (2007).
45. Gupta, S. *et al.* Prevention of cardiac hypertrophy and heart failure by silencing of NF-kappaB. *Journal of molecular biology* **375**, 637–49 (2008).
46. Ruiz-Ortega, M. *et al.* Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circulation research* **86**, 1266–72 (2000).
47. Matsui, Y. *et al.* Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circulation research* **100**, 914–22 (2007).
48. Zhu, H. *et al.* Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. *The Journal of clinical investigation* **117**, 1782–93 (2007).
49. Hill, J. A. & Olson, E. N. Cardiac plasticity. *The New England journal of medicine* **358**, 1370–80 (2008).
50. Cohn, J. N., Ferrari, R. & Sharpe, N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* **35**, 569–82 (2000).
51. Zeisberg, E. M. *et al.* Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nature medicine* **13**, 952–61 (2007).
52. Del Monte, F. *et al.* Restoration of Contractile Function in Isolated Cardiomyocytes From Failing Human Hearts by Gene Transfer of SERCA2a. *Circulation* **100**, 2308–2311 (1999).
53. Miyamoto, M. I. *et al.* Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 793–8 (2000).
54. Poole-Wilson, P. A. & Ferrari, R. Role of skeletal muscle in the syndrome of chronic heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* **28**, 2275–85 (1996).
55. Wilson, J. R. Evaluation of skeletal muscle fatigue in patients with heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* **28**, 2287–92 (1996).

56. Bigard, A. X. *et al.* Muscle unloading induces slow to fast transitions in myofibrillar but not mitochondrial properties. Relevance to skeletal muscle abnormalities in heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* **30**, 2391–401 (1998).
57. Lipkin, D. P., Jones, D. A., Round, J. M. & Poole-Wilson, P. A. Abnormalities of skeletal muscle in patients with chronic heart failure. *International journal of cardiology* **18**, 187–95 (1988).
58. Sullivan, M. J., Green, H. J. & Cobb, F. R. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation* **81**, 518–27 (1990).
59. Mancini, D. M., Henson, D., LaManca, J. & Levine, S. Respiratory muscle function and dyspnea in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation* **86**, 909–18 (1992).
60. De Sousa, E., Veksler, V., Bigard, X., Mateo, P. & Ventura-Clapier, R. Heart Failure Affects Mitochondrial but Not Myofibrillar Intrinsic Properties of Skeletal Muscle. *Circulation* **102**, 1847–1853 (2000).
61. Carvalho, R. F. *et al.* Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. *International journal of experimental pathology* **84**, 201–6 (2003).
62. Vescovo, G. *et al.* Skeletal muscle myosin heavy chain expression in rats with monocrotaline- induced cardiac hypertrophy and failure . Relation to blood flow and degree of muscle atrophy. *Cardiovascular Research* **39**, 233–241 (1998).
63. Carvalho, R. F. *et al.* Heart failure alters MyoD and MRF4 expressions in rat skeletal muscle. *International journal of experimental pathology* **87**, 219–25 (2006).
64. Carvalho, R. F. *et al.* Heart failure alters matrix metalloproteinase gene expression and activity in rat skeletal muscle. *International journal of experimental pathology* **87**, 437–43 (2006).
65. Lopes, F. D. S. *et al.* Down-regulation of MyoD gene expression in rat diaphragm muscle with heart failure. *International journal of experimental pathology* **89**, 216–22 (2008).
66. Simonini, A. *et al.* Heart failure in rats causes changes in skeletal muscle morphology and gene expression that are not explained by reduced activity. *Circulation research* **79**, 128–36 (1996).
67. Libera, L. D., Zennaro, R., Sandri, M., Ambrosio, G. B. & Vescovo, G. Apoptosis and atrophy in rat slow skeletal muscles in chronic heart failure. *The American journal of physiology* **277**, C982–6 (1999).
68. Harrington, D. *et al.* Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* **30**, 1758–64 (1997).

69. Toth, M. J., Ades, P. a, Lewinter, M. M., Tracy, R. P. & Tchernof, A. Skeletal muscle myofibrillar mRNA expression in heart failure: relationship to local and circulating hormones. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **100**, 35–41 (2006).
70. Anker, S. D. *et al.* Cytokines and neurohormones relating to body composition alterations in the wasting syndrome of chronic heart failure. *European heart journal* **20**, 683–93 (1999).
71. Poehlman, E. T. Special considerations in design of trials with elderly subjects: unexplained weight loss, body composition and energy expenditure. *The Journal of nutrition* **129**, 260S–263S (1999).
72. Conraads, V. M. A., Hoymans, V. Y. & Vrints, C. J. Heart failure and cachexia: insights offered from molecular biology. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **13**, 325–35 (2008).
73. Von Haehling, S., Doehner, W. & Anker, S. D. Nutrition, metabolism, and the complex pathophysiology of cachexia in chronic heart failure. *Cardiovascular research* **73**, 298–309 (2007).
74. Anker, S. D. *et al.* Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study. *Lancet* **361**, 1077–83 (2003).
75. Güller, I. & Russell, A. P. MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function. *The Journal of physiology* **588**, 4075–87 (2010).
76. Zanou, N. & Gailly, P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* (2013).doi:10.1007/s00018-013-1330-4
77. Pette, D. & Staron, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy research and technique* **50**, 500–9 (2000).
78. Smith, L. R., Meyer, G. & Lieber, R. L. Systems analysis of biological networks in skeletal muscle function. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* **5**, 55–71 (2013).
79. Braun, T. & Gautel, M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 349–61 (2011).
80. Hawke, T. J. & Garry, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **91**, 534–51 (2001).
81. Yin, H., Price, F. & Rudnicki, M. A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiological reviews* **93**, 23–67 (2013).
82. Engel, A. G. & Fanzine-Armstrong, C. *Myology*. (New York, 1937).

83. Turrina, A., Martínez-González, M. A. & Stecco, C. The muscular force transmission system: role of the intramuscular connective tissue. *Journal of bodywork and movement therapies* **17**, 95–102 (2013).
84. Gillies, A. & Lieber, R. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle & nerve* **44**, 318–331 (2011).
85. Flück, M. & Hoppeler, H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **146**, 159–216 (2003).
86. Huxley, H. E. The Mechanism of Muscular Contraction. *Science* **164**, 1356–1366 (1969).
87. Schiaffino, S. & Reggiani, C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiological reviews* **76**, 371–423 (1996).
88. Morita, H., Seidman, J. & Seidman, C. E. Review series Genetic causes of human heart failure. *Journal of Clinical Investigation* **115**, (2005).
89. Lowey, S., Slayter, H. S., Weeds, A. G. & Baker, H. Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *Journal of molecular biology* **42**, 1–29 (1969).
90. Weeds, A. G. & Lowey, S. Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin. *Journal of molecular biology* **61**, 701–25 (1971).
91. Elliott, A. & Offer, G. Shape and flexibility of the myosin molecule. *Journal of molecular biology* **123**, 505–19 (1978).
92. Dal Pai-Silva, M. & Carvalho, R. *Célula Muscular Estriada Esquelética*. 83–94 (Editora Manole: São Paulo, 2005).
93. Ganong, W. F. *Fisiologia Médica*. 800 (Piccin-Nuova Libreria: 2008).
94. Ranvier, L. Propriétés et structures différentes des muscles rouges et des muscles blanc, chez les lapins et chez les raises. *CR Hebd Acad Sci* **77**, 1030–1043 (1873).
95. DUBOWITZ, V. & PEARSE, A. G. A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie. Abteilung Histochemie* **2**, 105–17 (1960).
96. Ogata, T. A histochemical study of the red and white muscle fibres. I. Activity of the succinoxidase system in muscle fibres. *Acta Med. Okayama* **12**, 233–240 (1958).
97. Brooke, M. H. & Kaiser, K. K. Three “myosin adenosine triphosphatase” systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **18**, 670–2 (1970).

98. Talmadge, R. J., Roy, R. R. & Roy, R. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *Electrophoretic separation of rat skeletal myosin heavy-chain isoforms*. 2337–2340 (1993).
99. Bárány, M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *The Journal of general physiology* **50**, Suppl:197–218 (1967).
100. Pette, D. & Staron, R. S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochemistry and Cell Biology* 359–372 (2001).doi:10.1007/s004180100268
101. Schiaffino, S. & Reggiani, C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **77**, 493–501 (1994).
102. Biral, D., Betto, R., Danieli-Betto, D. & Salviati, G. Myosin heavy chain composition of single fibres from normal human muscle. *The Biochemical journal* **250**, 307–8 (1988).
103. Aigner, S. *et al.* Fast myosin heavy chain diversity in skeletal muscles of the rabbit: heavy chain II_d, not II_b predominates. *European journal of biochemistry / FEBS* **211**, 367–72 (1993).
104. Caiozzo, V. J. *et al.* Single-fiber myosin heavy chain polymorphism: how many patterns and what proportions? *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **285**, R570–80 (2003).
105. Di Maso, N. A., Caiozzo, V. J. & Baldwin, K. M. Single-fiber myosin heavy chain polymorphism during postnatal development: modulation by hypothyroidism. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **278**, R1099–106 (2000).
106. Pette, D. & Staron, R. S. Myosin Isoforms , Muscle Fiber Types , and Transitions. *Microscopy Research and Technique* **509**, 500–509 (2000).
107. Johnston, I. *Fish Physiology: Muscle Development and Growth*. (San Diego, 2001).
108. Peter, J. B., Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Gillespie, C. A. & Stempel, K. E. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* **11**, 2627–33 (1972).
109. Carrow, R. E., Brown, R. E. & Van Huss, W. D. Fiber sizes and capillary to fiber ratios in skeletal muscle of exercised rats. *The Anatomical record* **159**, 33–9 (1967).
110. Gray, S. D., McDonagh, P. F. & Gore, R. W. Comparison of functional and total capillary densities in fast and slow muscles of the chicken. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **397**, 209–13 (1983).
111. Pette, D. & Staron, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy research and technique* **50**, 500–9 (2000).

112. Campos, G. E. R. *et al.* Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *European journal of applied physiology* **88**, 50–60 (2002).
113. Magaúdda, L., Mauro, D. Di, Trimarchi, F., Anastasi, G. & Messina, G. M. Effects of Physical Exercise on Skeletal Ultrastructural and Molecular Aspects Muscle Fiber : *Basic Appl Myol* **14**, 17–21 (2004).
114. Flück, M. & Hoppeler, H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **146**, 159–216 (2003).
115. BULLER, A. J., ECCLES, J. C. & ECCLES, R. M. Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *The Journal of physiology* **150**, 417–39 (1960).
116. Gutmann, E., Melichna, J. & Syrový, I. Contraction properties and ATPase activity in fast and slow muscle of the rat during denervation. *Experimental neurology* **36**, 488–97 (1972).
117. Simoneau, J. A. & Pette, D. Species-specific effects of chronic nerve stimulation upon tibialis anterior muscle in mouse, rat, guinea pig, and rabbit. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **412**, 86–92 (1988).
118. Klitgaard, H. *et al.* Function, morphology and protein expression of ageing skeletal muscle: a cross-sectional study of elderly men with different training backgrounds. *Acta physiologica Scandinavica* **140**, 41–54 (1990).
119. Frontera, W. R., Hughes, V. A., Lutz, K. J. & Evans, W. J. A cross-sectional study of muscle strength and mass in 45- to 78-yr-old men and women. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **71**, 644–50 (1991).
120. Caiozzo, V. J., Herrick, R. E. & Baldwin, K. M. Response of slow and fast muscle to hypothyroidism: maximal shortening velocity and myosin isoforms. *The American journal of physiology* **263**, C86–94 (1992).
121. Demirel, H. a, Powers, S. K., Naito, H., Hughes, M. & Coombes, J. S. Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **86**, 1002–8 (1999).
122. Williamson, D. L., Godard, M. P., Porter, D. A., Costill, D. L. & Trappe, S. W. Progressive resistance training reduces myosin heavy chain coexpression in single muscle fibers from older men. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **88**, 627–33 (2000).
123. Sharman, M. J. *et al.* Changes in myosin heavy chain composition with heavy resistance training in 60- to 75-year-old men and women. *European journal of applied physiology* **84**, 127–32

124. Cunha, T. S., Tanno, A. P., Costa Sampaio Moura, M. J. & Marcondes, F. K. Influence of high-intensity exercise training and anabolic androgenic steroid treatment on rat tissue glycogen content. *Life sciences* **77**, 1030–43 (2005).
125. Willoughby, D. S. & Rosene, J. M. Effects of oral creatine and resistance training on myogenic regulatory factor expression. *Medicine and science in sports and exercise* **35**, 923–9 (2003).
126. Siu, P. M., Donley, D. A., Bryner, R. W. & Alway, S. E. Myogenin and oxidative enzyme gene expression levels are elevated in rat soleus muscles after endurance training. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **97**, 277–85 (2004).
127. Carvalho, R. F. *et al.* Heart failure alters MyoD and MRF4 expressions in rat skeletal muscle. *International journal of experimental pathology* **87**, 219–225 (2006).
128. Ambros, V. *et al.* A uniform system for microRNA annotation. 277–279 (2003).doi:10.1261/rna.2183803.One
129. Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* **19**, 92–105 (2009).
130. Bushati, N. & Cohen, S. M. microRNA functions. *Annual review of cell and developmental biology* **23**, 175–205 (2007).
131. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews. Genetics* **9**, 102–14 (2008).
132. Eulalio, A., Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* **132**, 9–14 (2008).
133. Chekulaeva, M. & Filipowicz, W. Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Current opinion in cell biology* **21**, 452–60 (2009).
134. Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature reviews. Genetics* **12**, 99–110 (2011).
135. Lee, S. & Vasudevan, S. Post-transcriptional stimulation of gene expression by microRNAs. *Advances in experimental medicine and biology* **768**, 97–126 (2013).
136. Chendrimada, T. P. *et al.* MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* **447**, 823–8 (2007).
137. Maroney, P. A., Yu, Y., Fisher, J. & Nilsen, T. W. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nature structural & molecular biology* **13**, 1102–7 (2006).

138. Kim, J. *et al.* Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 360–5 (2004).
139. Lanet, E. *et al.* Biochemical evidence for translational repression by Arabidopsis microRNAs. *The Plant cell* **21**, 1762–8 (2009).
140. Nottrott, S., Simard, M. J. & Richter, J. D. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature structural & molecular biology* **13**, 1108–14 (2006).
141. Petersen, C. P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J. & Sharp, P. a Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular cell* **21**, 533–42 (2006).
142. Ul Hussain, M. Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell and tissue research* **349**, 405–13 (2012).
143. Bagga, S. *et al.* Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* **122**, 553–63 (2005).
144. Eulalio, A., Huntzinger, E. & Nishihara, T. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *Rna* **15**, 21–32 (2009).
145. Tarun, S. Z., Wells, S. E., Deardorff, J. A. & Sachs, A. B. Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail-dependent translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 9046–51 (1997).
146. Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I. K. & Preiss, T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 16961–6 (2005).
147. Behm-Ansmant, I. *et al.* mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & development* **20**, 1885–98 (2006).
148. Cifuentes, D. *et al.* A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science (New York, N.Y.)* **328**, 1694–8 (2010).
149. Wu, L., Fan, J. & Belasco, J. G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 4034–9 (2006).
150. Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D. & Izaurralde, E. A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA (New York, N.Y.)* **11**, 1640–7 (2005).
151. Vasudevan, S. & Steitz, J. A. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* **128**, 1105–18 (2007).

152. Ørom, U. A., Nielsen, F. C. & Lund, A. H. MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. *Molecular cell* **30**, 460–71 (2008).
153. Henke, J. I. *et al.* microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *The EMBO journal* **27**, 3300–10 (2008).
154. Jopling, C. L., Schütz, S. & Sarnow, P. Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell host & microbe* **4**, 77–85 (2008).
155. Ventura, A. *et al.* Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* **132**, 875–86 (2008).
156. Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S. & Kim, V. N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal* **21**, 4663–70 (2002).
157. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 126–39 (2009).
158. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* **23**, 4051–60 (2004).
159. Cai, X., Hagedorn, C. H. & Cullen, B. R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA (New York, N.Y.)* **10**, 1957–66 (2004).
160. Kim, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 376–85 (2005).
161. Borchert, G. M., Lanier, W. & Davidson, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology* **13**, 1097–101 (2006).
162. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–9 (2003).
163. Han, J. *et al.* The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development* **18**, 3016–27 (2004).
164. Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. a, Ketting, R. F. & Hannon, G. J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**, 231–5 (2004).
165. Gregory, R. I. *et al.* The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**, 235–40 (2004).
166. Landthaler, M., Yalcin, A. & Tuschl, T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Current biology : CB* **14**, 2162–7 (2004).

167. Zeng, Y. & Cullen, B. R. Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *The Journal of biological chemistry* **280**, 27595–603 (2005).
168. Han, J. *et al.* Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* **125**, 887–901 (2006).
169. Berezikov, E., Chung, W., Willis, J., Cuppen, E. & Lai, E. C. Mammalian mirtron genes. *Molecular cell* **28**, 328–36 (2007).
170. Okamura, K., Hagen, J. W., Duan, H., Tyler, D. M. & Lai, E. C. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* **130**, 89–100 (2007).
171. Ruby, J. G., Jan, C. H. & Bartel, D. P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* **448**, 83–6 (2007).
172. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development* **17**, 3011–6 (2003).
173. Bohnsack, M. T., Czaplinski, K. & Gorlich, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA (New York, N.Y.)* **10**, 185–91 (2004).
174. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. & Kutay, U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science (New York, N.Y.)* **303**, 95–8 (2004).
175. Hutvagner, G. *et al.* A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science (New York, N.Y.)* **293**, 834–8 (2001).
176. Rand, T. a, Petersen, S., Du, F. & Wang, X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* **123**, 621–9 (2005).
177. Salzman, D. W., Shubert-Coleman, J. & Furneaux, H. P68 RNA helicase unwinds the human let-7 microRNA precursor duplex and is required for let-7-directed silencing of gene expression. *The Journal of biological chemistry* **282**, 32773–9 (2007).
178. Schwarz, D. S. *et al.* Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199–208 (2003).
179. Lim, L. P. *et al.* Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**, 769–73 (2005).
180. Lee, Y. S. & Dutta, A. MicroRNAs in cancer. *Annual review of pathology* **4**, 199–227 (2009).
181. Sen, G. L. & Blau, H. M. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nature cell biology* **7**, 633–6 (2005).

182. Doench, J. G. & Sharp, P. A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & development* **18**, 504–11 (2004).
183. Esau, C. *et al.* miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell metabolism* **3**, 87–98 (2006).
184. Leung, A. K. L. & Sharp, P. a microRNAs: a safeguard against turmoil? *Cell* **130**, 581–5 (2007).
185. Latronico, M. V. G., Catalucci, D. & Condorelli, G. Emerging role of microRNAs in cardiovascular biology. *Circulation research* **101**, 1225–36 (2007).
186. Thum, T., Catalucci, D. & Bauersachs, J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovascular research* **79**, 562–70 (2008).
187. Van Rooij, E., Liu, N. & Olson, E. N. MicroRNAs flex their muscles. *Trends in genetics : TIG* **24**, 159–66 (2008).
188. Callis, T. E., Deng, Z., Chen, J.-F. & Wang, D.-Z. Muscling through the microRNA world. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* **233**, 131–8 (2008).
189. Chen, J. *et al.* The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature genetics* **38**, 228–33 (2006).
190. Flynt, A. S., Li, N., Thatcher, E. J., Solnica-Krezel, L. & Patton, J. G. Zebrafish miR-214 modulates Hedgehog signaling to specify muscle cell fate. *Nature genetics* **39**, 259–63 (2007).
191. Kim, H. K., Lee, Y. S., Sivaprasad, U., Malhotra, A. & Dutta, A. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *The Journal of cell biology* **174**, 677–87 (2006).
192. McCarthy, J. J., Esser, K. a & Andrade, F. H. MicroRNA-206 is overexpressed in the diaphragm but not the hindlimb muscle of mdx mouse. *American journal of physiology. Cell physiology* **293**, C451–7 (2007).
193. Naguibneva, I. *et al.* The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nature cell biology* **8**, 278–84 (2006).
194. Sayed, D., Hong, C., Chen, I.-Y., Lypowy, J. & Abdellatif, M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circulation research* **100**, 416–24 (2007).
195. Van Rooij, E. *et al.* Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science (New York, N.Y.)* **316**, 575–9 (2007).
196. Wong, C. F. & Tellam, R. L. MicroRNA-26a targets the histone methyltransferase Enhancer of Zeste homolog 2 during myogenesis. *The Journal of biological chemistry* **283**, 9836–43 (2008).

197. Greco, S. *et al.* Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **23**, 3335–46 (2009).
198. Davies, K. E. & Nowak, K. J. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 762–73 (2006).
199. Eisenberg, I. *et al.* Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 17016–21 (2007).
200. McCarthy, J. J. & Esser, K. a MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **102**, 306–13 (2007).
201. McCarthy, J. J., Esser, K. a, Peterson, C. a & Dupont-Versteegden, E. E. Evidence of MyomiR network regulation of beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy. *Physiological genomics* **39**, 219–26 (2009).
202. Wang, H. *et al.* NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer cell* **14**, 369–81 (2008).
203. Clop, A. *et al.* A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nature genetics* **38**, 813–8 (2006).
204. Lee, S.-J. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annual review of cell and developmental biology* **20**, 61–86 (2004).
205. Tobin, J. F. & Celeste, A. J. Myostatin, a negative regulator of muscle mass: implications for muscle degenerative diseases. *Current opinion in pharmacology* **5**, 328–32 (2005).
206. Cheng, Y. *et al.* MicroRNAs Are Aberrantly Expressed in Hypertrophic Heart: Do They Play a Role in Cardiac Hypertrophy? *American Journal Of Pathology* **170**, 1831–1840 (2007).
207. Tatsuguchi, M. *et al.* Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology* **42**, 1137–41 (2007).
208. Van Rooij, E. *et al.* A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 18255–60 (2006).
209. Van Rooij, E. *et al.* Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 13027–32 (2008).

210. Ikeda, S. *et al.* Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiological genomics* **31**, 367–73 (2007).
211. Reindel, J. F., Ganey, P. E., Wagner, J. G., Slocombe, R. F. & Roth, R. A. Development of morphologic, hemodynamic, and biochemical changes in lungs of rats given monocrotaline pyrrole. *Toxicology and applied pharmacology* **106**, 179–200 (1990).
212. Staron, R. S. *et al.* Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochemistry and cell biology* **111**, 117–23 (1999).
213. Bustin, S. a *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* **55**, 611–22 (2009).
214. Fleige, S. & Pfaffl, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular aspects of medicine* **27**, 126–39 (2006).
215. Becker, C., Hammerle-Fickinger, a, Riedmaier, I. & Pfaffl, M. W. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods (San Diego, Calif.)* **50**, 237–43 (2010).
216. Chen, C. *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research* **33**, e179 (2005).
217. Mestdagh, P. *et al.* High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA. *Nucleic acids research* **36**, e143 (2008).
218. Lefever, S. *et al.* RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucleic acids research* **37**, 2065–9 (2009).
219. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* **25**, 402–8 (2001).
220. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* **3**, RESEARCH0034 (2002).
221. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research* **30**, e36 (2002).
222. Ruijter, J. M. *et al.* Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research* **37**, e45 (2009).
223. Meyer, S. U., Kaiser, S., Wagner, C., Thirion, C. & Pfaffl, M. W. Profound effect of profiling platform and normalization strategy on detection of differentially expressed microRNAs--a comparative study. *PloS one* **7**, e38946 (2012).

224. Kuhn, D. E. *et al.* Experimental validation of miRNA targets. *Methods (San Diego, Calif.)* **44**, 47–54 (2008).
225. Enright, A. J. *et al.* MicroRNA targets in Drosophila. *Genome biology* **5**, R1 (2003).
226. Min, H. & Yoon, S. Got target?: computational methods for microRNA target prediction and their extension. *Experimental and Molecular Medicine* **42**, 233 (2010).
227. Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**, 15–20 (2005).
228. Grimson, A., Farh, K. & Johnston, W. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular cell* (2007).doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.017>
229. Lewis, B. P., Shih, I., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. & Burge, C. B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**, 787–98 (2003).
230. Dweep, H., Sticht, C., Pandey, P. & Gretz, N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *Journal of biomedical informatics* **44**, 839–47 (2011).
231. Xiao, F. *et al.* miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic acids research* **37**, D105–10 (2009).
232. Kay, J. M., Harris, P. & Heath, D. Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax* **22**, 176–9 (1967).
233. Gary-Bobo, G. *et al.* Effects of HIV protease inhibitors on progression of monocrotaline- and hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation* **122**, 1937–47 (2010).
234. Simonini, a, Massie, B. M., Long, C. S., Qi, M. & Samarel, a M. Alterations in skeletal muscle gene expression in the rat with chronic congestive heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* **28**, 1683–91 (1996).
235. Delp, M. D., Duan, C., Mattson, J. P. & Musch, T. I. Changes in skeletal muscle biochemistry and histology relative to fiber type in rats with heart failure. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **83**, 1291–9 (1997).
236. Libera, L. D. & Vescovo, G. Muscle wastage in chronic heart failure, between apoptosis, catabolism and altered anabolism: a chimaeric view of inflammation? *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **7**, 435–41 (2004).
237. Steffen, B. T., Lees, S. J. & Booth, F. W. Anti-TNF treatment reduces rat skeletal muscle wasting in monocrotaline-induced cardiac cachexia. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **105**, 1950–8 (2008).

238. Carvalho, R. F. *et al.* Heart failure increases atrogen-1 and MuRF1 gene expression in skeletal muscle with fiber type-specific atrophy. *Journal of molecular histology* **41**, 81–7 (2010).
239. Wüst, R. C. I. *et al.* Regional skeletal muscle remodeling and mitochondrial dysfunction in right ventricular heart failure. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **302**, H402–11 (2012).
240. Martinez, P. F. *et al.* Chronic heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and changes in myogenic regulatory factors. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* **16**, BR374–83 (2010).
241. Damatto, R. L. *et al.* Heart failure-induced skeletal myopathy in spontaneously hypertensive rats. *International journal of cardiology* (2012).doi:10.1016/j.ijcard.2012.03.063
242. Piepoli, M. F. & Coats, A. J. S. The “skeletal muscle hypothesis in heart failure” revised. *European heart journal* 7–9 (2013).doi:10.1093/eurheartj/ehs463
243. Rehn, T. a, Munkvik, M., Lunde, P. K., Sjaastad, I. & Sejersted, O. M. Intrinsic skeletal muscle alterations in chronic heart failure patients: a disease-specific myopathy or a result of deconditioning? *Heart failure reviews* **17**, 421–36 (2012).
244. Tracey, K. J. *et al.* Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *The Journal of experimental medicine* **167**, 1211–27 (1988).
245. Moylan, J. S., Smith, J. D., Chambers, M. a, McLoughlin, T. J. & Reid, M. B. TNF induction of atrogen-1/MAFbx mRNA depends on Foxo4 expression but not AKT-Foxo1/3 signaling. *American journal of physiology. Cell physiology* **295**, C986–93 (2008).
246. Li, Y. P. & Reid, M. B. NF-kappaB mediates the protein loss induced by TNF-alpha in differentiated skeletal muscle myotubes. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **279**, R1165–70 (2000).
247. Dalla Libera, L. *et al.* Apoptosis in the skeletal muscle of rats with heart failure is associated with increased serum levels of TNF-alpha and sphingosine. *Journal of molecular and cellular cardiology* **33**, 1871–8 (2001).
248. Anker, S. D. *et al.* Tumor necrosis factor and steroid metabolism in chronic heart failure: possible relation to muscle wasting. *Journal of the American College of Cardiology* **30**, 997–1001 (1997).
249. Acharyya, S. *et al.* Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. *Regulation* **114**, (2004).
250. Cai, D. *et al.* IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* **119**, 285–98 (2004).

251. Levine, B., Kalman, J., Mayer, L., Fillit, H. M. & Packer, M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *The New England journal of medicine* **323**, 236–41 (1990).
252. McMurray, J., Abdullah, I., Dargie, H. J. & Shapiro, D. Increased concentrations of tumour necrosis factor in “cachectic” patients with severe chronic heart failure. *British heart journal* **66**, 356–8 (1991).
253. Bodine, S. C. *et al.* Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science (New York, N.Y.)* **294**, 1704–8 (2001).
254. Gomes, M. D., Lecker, S. H., Jagoe, R. T., Navon, A. & Goldberg, A. L. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 14440–5 (2001).
255. Dehoux, M. J. ., Van Beneden, R. P., Fernández-Celemín, L., Lause, P. L. & Thissen, J.-P. M. Induction of MafBx and Murf ubiquitin ligase mRNAs in rat skeletal muscle after LPS injection. *FEBS Letters* **544**, 214–217 (2003).
256. Van Rooij, E. *et al.* A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Developmental cell* **17**, 662–73 (2009).
257. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–54 (1993).
258. Bentwich, I. Prediction and validation of microRNAs and their targets. *FEBS letters* **579**, 5904–10 (2005).
259. Rajewsky, N. microRNA target predictions in animals. *Nature genetics* **38 Suppl**, S8–13 (2006).
260. Didiano, D. & Hobert, O. Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nature structural & molecular biology* **13**, 849–51 (2006).
261. Maziere, P. & Enright, A. Prediction of microRNA targets. *Drug discovery today* **12**, 452–8 (2007).
262. Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B. & Cohen, S. M. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS biology* **3**, e85 (2005).
263. Watanabe, Y., Tomita, M. & Kanai, A. Computational methods for microRNA target prediction. *Methods in enzymology* **427**, 65–86 (2007).
264. Stark, A., Brennecke, J., Bushati, N., Russell, R. B. & Cohen, S. M. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* **123**, 1133–46 (2005).
265. Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215–33 (2009).

266. Hayden, M. S. & Ghosh, S. Signaling to NF-kappaB. *Genes & development* **18**, 2195–224 (2004).
267. Baeuerle, P. A. & Baltimore, D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science (New York, N.Y.)* **242**, 540–6 (1988).
268. Yaron, A. *et al.* Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase. *Nature* **396**, 590–4 (1998).
269. Karin, M. & Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annual review of immunology* **18**, 621–63 (2000).
270. Wang, H. *et al.* NF-kappaB regulation of YY1 inhibits skeletal myogenesis through transcriptional silencing of myofibrillar genes. *Molecular and cellular biology* **27**, 4374–87 (2007).
271. Guttridge, D. C., Mayo, M. W., Madrid, L. V, Wang, C. Y. & Baldwin, a S. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science (New York, N.Y.)* **289**, 2363–6 (2000).
272. Ladner, K. J., Caligiuri, M. a & Guttridge, D. C. Tumor necrosis factor-regulated biphasic activation of NF-kappa B is required for cytokine-induced loss of skeletal muscle gene products. *The Journal of biological chemistry* **278**, 2294–303 (2003).
273. Reid, M. B. & Li, Y. P. Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective. *Respiratory research* **2**, 269–72 (2001).
274. Hunter, R. B. & Kandarian, S. C. Disruption of either the Nfkb1 or the Bcl3 gene inhibits skeletal muscle atrophy. *The Journal of clinical investigation* **114**, 1504–11 (2004).
275. Yamaki, T. *et al.* Rel A/p65 is required for cytokine-induced myotube atrophy. *American journal of physiology. Cell physiology* **303**, C135–42 (2012).
276. Zhou, L. *et al.* Inhibition of miR-29 by TGF-beta-Smad3 signaling through dual mechanisms promotes transdifferentiation of mouse myoblasts into myofibroblasts. *PloS one* **7**, e33766 (2012).
277. Juan, A. H., Kumar, R. M., Marx, J. G., Young, R. a & Sartorelli, V. Mir-214-dependent regulation of the polycomb protein Ezh2 in skeletal muscle and embryonic stem cells. *Molecular cell* **36**, 61–74 (2009).
278. Cheung, T. H. *et al.* Maintenance of muscle stem-cell quiescence by microRNA-489. *Nature* **482**, 524–8 (2012).

Figura suplementar 2. Configuração do *Rat Endogenous Control Array*

Rat Endogenous Control Array

A	Actb	Actb	Actb	Arbp	Arbp	Arbp	B2m	B2m	B2m	18S	18S	18S	Gapdh	Gapdh	Gapdh	Gusb	Gusb	Gusb	Ppia	Ppia	Ppia	Ppib	Ppib	Ppib	1
B	Hprt	Hprt	Hprt	Tbp	Tbp	Tbp	Hmbs	Hmbs	Hmbs	Ywhaz	Ywhaz	Ywhaz	Pgk1	Pgk1	Pgk1	Rplp2	Rplp2	Rplp2	Tfrc	Tfrc	Tfrc	Ubc	Ubc	Ubc	2
C	Actb	Actb	Actb	Arbp	Arbp	Arbp	B2m	B2m	B2m	18S	18S	18S	Gapdh	Gapdh	Gapdh	Gusb	Gusb	Gusb	Ppia	Ppia	Ppia	Ppib	Ppib	Ppib	3
D	Hprt	Hprt	Hprt	Tbp	Tbp	Tbp	Hmbs	Hmbs	Hmbs	Ywhaz	Ywhaz	Ywhaz	Pgk1	Pgk1	Pgk1	Rplp2	Rplp2	Rplp2	Tfrc	Tfrc	Tfrc	Ubc	Ubc	Ubc	4
E	Actb	Actb	Actb	Arbp	Arbp	Arbp	B2m	B2m	B2m	18S	18S	18S	Gapdh	Gapdh	Gapdh	Gusb	Gusb	Gusb	Ppia	Ppia	Ppia	Ppib	Ppib	Ppib	5
F	Hprt	Hprt	Hprt	Tbp	Tbp	Tbp	Hmbs	Hmbs	Hmbs	Ywhaz	Ywhaz	Ywhaz	Pgk1	Pgk1	Pgk1	Rplp2	Rplp2	Rplp2	Tfrc	Tfrc	Tfrc	Ubc	Ubc	Ubc	6
G	Actb	Actb	Actb	Arbp	Arbp	Arbp	B2m	B2m	B2m	18S	18S	18S	Gapdh	Gapdh	Gapdh	Gusb	Gusb	Gusb	Ppia	Ppia	Ppia	Ppib	Ppib	Ppib	7
H	Hprt	Hprt	Hprt	Tbp	Tbp	Tbp	Hmbs	Hmbs	Hmbs	Ywhaz	Ywhaz	Ywhaz	Pgk1	Pgk1	Pgk1	Rplp2	Rplp2	Rplp2	Tfrc	Tfrc	Tfrc	Ubc	Ubc	Ubc	8
I	Actb	Actb	Actb	Arbp	Arbp	Arbp	B2m	B2m	B2m	18S	18S	18S	Gapdh	Gapdh	Gapdh	Gusb	Gusb	Gusb	Ppia	Ppia	Ppia	Ppib	Ppib	Ppib	
J	Hprt	Hprt	Hprt	Tbp	Tbp	Tbp	Hmbs	Hmbs	Hmbs	Ywhaz	Ywhaz	Ywhaz	Pgk1	Pgk1	Pgk1	Rplp2	Rplp2	Rplp2	Tfrc	Tfrc	Tfrc	Ubc	Ubc	Ubc	
K	Actb	Actb	Actb	Arbp	Arbp	Arbp	B2m	B2m	B2m	18S	18S	18S	Gapdh	Gapdh	Gapdh	Gusb	Gusb	Gusb	Ppia	Ppia	Ppia	Ppib	Ppib	Ppib	
L	Hprt	Hprt	Hprt	Tbp	Tbp	Tbp	Hmbs	Hmbs	Hmbs	Ywhaz	Ywhaz	Ywhaz	Pgk1	Pgk1	Pgk1	Rplp2	Rplp2	Rplp2	Tfrc	Tfrc	Tfrc	Ubc	Ubc	Ubc	
M	Actb	Actb	Actb	Arbp	Arbp	Arbp	B2m	B2m	B2m	18S	18S	18S	Gapdh	Gapdh	Gapdh	Gusb	Gusb	Gusb	Ppia	Ppia	Ppia	Ppib	Ppib	Ppib	
N	Hprt	Hprt	Hprt	Tbp	Tbp	Tbp	Hmbs	Hmbs	Hmbs	Ywhaz	Ywhaz	Ywhaz	Pgk1	Pgk1	Pgk1	Rplp2	Rplp2	Rplp2	Tfrc	Tfrc	Tfrc	Ubc	Ubc	Ubc	
O	Actb	Actb	Actb	Arbp	Arbp	Arbp	B2m	B2m	B2m	18S	18S	18S	Gapdh	Gapdh	Gapdh	Gusb	Gusb	Gusb	Ppia	Ppia	Ppia	Ppib	Ppib	Ppib	
P	Hprt	Hprt	Hprt	Tbp	Tbp	Tbp	Hmbs	Hmbs	Hmbs	Ywhaz	Ywhaz	Ywhaz	Pgk1	Pgk1	Pgk1	Rplp2	Rplp2	Rplp2	Tfrc	Tfrc	Tfrc	Ubc	Ubc	Ubc	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	Port

Lista dos genes representados na placa: 18S rRNA, Actb, Arbp, B2m, Gapdh, Gusb, Hmbs, Hprt, Pgk1, Ppia, Ppib, Rplp2, Tbp, Tfrc, Ubc e Ywhaz

Tabela Suplementar 1. Conjunto de dados do perfil de expressão de miRNAs no músculo esquelético de ratos com insuficiência cardíaca utilizando o TaqMan Low Density Arrays baseado na RT-qPCR com o grupo controle como referência (RQ=1).

MicroRNA alvo	Média Ct	RQ	RQ Min	RQ Max	Valor de P
mmu-miR-29a-4395223	24,473	1,520	1,336	1,728	0,000
mmu-miR-539-4378103	26,400	1,906	1,546	2,350	0,001
mmu-miR-434-3p-4395734	27,236	1,936	1,745	2,147	0,001
rno-miR-489-001353	30,567	0,472	0,335	0,665	0,003
hsa-miR-28-3p-002446	27,929	0,785	0,674	0,914	0,004
rno-miR-632-241110_mat	32,333	0,515	0,390	0,679	0,005
hsa-miR-214-000517	28,545	0,583	0,470	0,722	0,005
rno-miR-1-4395765	20,039	1,223	1,106	1,353	0,006
mmu-miR-376c-4395580	30,819	1,575	1,307	1,899	0,006
mmu-miR-322-4378107	29,039	1,705	1,341	2,168	0,008
mmu-miR-30a-4373061	26,347	1,184	1,074	1,305	0,009
mmu-miR-204-4373094	30,342	1,504	1,217	1,859	0,009
hsa-miR-149-002255	25,894	0,763	0,627	0,927	0,010
mmu-miR-331-3p-4373046	27,517	1,583	1,273	1,970	0,012
rno-miR-146B-002755	28,542	0,585	0,443	0,771	0,016
hsa-miR-27a#-002445	30,662	2,218	1,465	3,358	0,018
mmu-miR-29b-4373288	33,492	2,554	1,151	5,668	0,020
mmu-miR-210-4373089	28,264	1,722	1,199	2,474	0,022
hsa-miR-214#-002293	31,932	0,674	0,499	0,911	0,024
mmu-miR-136-4395641	29,777	1,877	1,399	2,518	0,024
mmu-miR-146a-4373132	25,815	0,748	0,575	0,973	0,026
mmu-miR-2146-241082_mat	23,582	0,680	0,512	0,904	0,027
mmu-miR-30b-4373290	24,723	1,142	1,023	1,274	0,027
mmu-miR-337-5p-4395645	31,056	1,975	1,480	2,636	0,030
mmu-miR-132-4373143	29,414	2,261	1,335	3,832	0,032
hsa-miR-30d#-002305	31,446	0,625	0,440	0,887	0,040
mmu-miR-322#-002506	29,126	1,361	1,085	1,709	0,042
rno-miR-450a-4381124	31,653	1,679	1,167	2,415	0,046
mmu-miR-30c-4373060	23,386	1,234	1,051	1,449	0,048
mmu-miR-340-5p-4395369	33,847	0,496	0,288	0,855	0,054
rno-miR-125b#-002074	30,901	0,826	0,681	1,001	0,055
mmu-let-7g-4395393	28,179	1,230	1,002	1,512	0,058
mmu-miR-185-4395382	33,476	0,430	0,197	0,942	0,061
hsa-miR-140-3p-002234	29,366	0,799	0,714	0,894	0,061
mmu-miR-199a-3p-4395415	27,869	0,831	0,715	0,966	0,061
mmu-miR-503#-002536	34,884	2,771	1,200	6,397	0,064
mmu-let-7b-4373168	29,392	0,692	0,537	0,893	0,067
mmu-miR-23b-4373073	30,722	1,491	1,064	2,090	0,074
mmu-miR-193b-4395597	27,476	0,809	0,645	1,014	0,079
mmu-let-7a#-002478	32,490	0,678	0,430	1,070	0,081
mmu-miR-542-5p-4395693	33,274	2,086	0,969	4,494	0,081
mmu-miR-214-4395417	29,331	0,747	0,683	0,817	0,083
mmu-miR-374-5p-001319	26,901	0,793	0,633	0,995	0,084
mmu-miR-15a#-002488	38,270	0,086	0,001	10,102	0,085
mmu-miR-202-3p-4373311	32,281	0,662	0,394	1,113	0,090
mmu-miR-19b-4373098	26,358	1,333	0,959	1,855	0,090

mmu-miR-200c-4395411	32,594	2,341	1,287	4,258	0,092
mmu-miR-130b-4373144	30,881	0,594	0,254	1,389	0,097
mmu-miR-337-000193	31,695	1,442	0,943	2,204	0,100
mmu-miR-205-4373093	34,758	0,506	0,169	1,520	0,103
mmu-miR-877#-002548	30,433	0,778	0,569	1,065	0,103
mmu-miR-30d-4373059	27,330	1,111	1,014	1,217	0,109
mmu-miR-1896-121128_mat	31,420	0,680	0,411	1,123	0,110
mmu-miR-223-4395406	26,782	1,185	1,022	1,375	0,114
mmu-miR-28#-002545	28,802	0,754	0,547	1,039	0,119
mmu-miR-26a-4395166	24,391	1,138	0,976	1,327	0,119
mmu-miR-690-001677	28,987	0,375	0,201	0,700	0,120
mmu-miR-685-4386748	32,566	1,803	0,575	5,652	0,122
mmu-miR-376b#-002451	30,629	1,586	1,139	2,209	0,134
mmu-miR-497-4381046	31,003	0,778	0,563	1,075	0,136
hsa-miR-299-5p-000600	31,462	2,328	1,490	3,638	0,136
mmu-miR-133a-4395357	17,328	1,234	0,784	1,941	0,147
mmu-miR-872-4395375	33,760	0,760	0,554	1,043	0,150
mmu-miR-155-4395701	30,452	1,460	1,033	2,064	0,150
mmu-miR-1894-3p-241002_mat	34,044	0,623	0,465	0,835	0,156
mmu-miR-125a-3p-4395310	34,638	2,292	1,044	5,036	0,156
rno-miR-345-3p-4395762	33,537	0,443	0,153	1,281	0,160
mmu-miR-92a-4373013	29,991	1,283	0,872	1,887	0,161
rno-miR-7a#-002062	28,260	1,128	0,986	1,290	0,164
hsa-miR-26b#-002444	33,646	1,417	0,462	4,343	0,164
mmu-miR-191-4395410	22,609	1,252	0,785	1,998	0,165
mmu-miR-186-4395396	27,499	1,180	0,839	1,661	0,167
mmu-miR-487b-4378102	31,689	1,272	0,913	1,771	0,172
hsa-miR-27b#-002174	31,962	1,716	0,944	3,122	0,175
mmu-miR-411-4381013	28,173	1,415	1,119	1,791	0,176
mmu-miR-1939-121180_mat	33,137	1,324	0,851	2,060	0,185
mmu-miR-133b-4395358	21,383	1,133	0,927	1,386	0,186
mmu-miR-19a-4373099	30,326	1,270	0,836	1,929	0,192
mmu-miR-410-4378093	31,998	1,492	1,077	2,066	0,193
mmu-miR-380-5p-4395731	32,942	2,722	2,158	3,434	0,196
mmu-miR-7a-4378130	34,021	4,440	1,630	12,092	0,196
rno-miR-351-4395764	32,020	1,509	0,818	2,783	0,197
mmu-miR-30e-4395334	25,376	1,100	0,925	1,306	0,202
mmu-miR-126-3p-4395339	21,444	1,148	0,842	1,566	0,203
hsa-miR-324-3p-000579	30,077	0,611	0,406	0,919	0,204
mmu-miR-193#-002577	32,892	0,717	0,409	1,255	0,204
hsa-miR-136#-002100	30,499	1,465	1,210	1,774	0,208
mmu-miR-17-4395419	27,641	1,153	0,881	1,508	0,210
mmu-miR-301b-4395730	33,778	0,526	0,238	1,162	0,212
mmu-miR-134-4373299	31,548	0,700	0,382	1,281	0,217
mmu-miR-106b-4373155	32,079	0,724	0,424	1,234	0,217
mmu-miR-101b-002531	28,939	1,115	0,924	1,346	0,220
mmu-miR-449a-4373207	33,726	3,486	1,208	10,063	0,220
mmu-miR-485-3p-001943	33,299	0,576	0,199	1,670	0,222
hsa-miR-93#-002139	30,584	0,765	0,539	1,088	0,222
mmu-miR-1839-3p-121203_mat	32,599	0,645	0,298	1,395	0,224
mmu-miR-146b-4373178	27,424	0,853	0,670	1,086	0,229

mmu-miR-1897-5p-121199_mat	31,190	0,627	0,318	1,240	0,236
mmu-miR-98-4373009	32,945	1,848	0,885	3,859	0,240
mmu-miR-2135-241140_mat	28,826	0,765	0,565	1,035	0,249
mmu-miR-34a-4395168	29,837	1,756	1,492	2,065	0,257
mmu-miR-1954-121137_mat	32,448	1,259	0,216	7,333	0,258
mmu-miR-10b-4395329	31,828	1,347	0,927	1,957	0,258
mmu-miR-1961-197391_mat	31,963	0,730	0,451	1,180	0,264
mmu-miR-138-4395395	30,071	0,876	0,690	1,112	0,265
hsa-miR-338-5P-002658	30,652	1,457	0,507	4,184	0,265
hsa-miR-99b#-002196	32,909	0,463	0,128	1,670	0,266
mmu-miR-194-4373106	32,716	1,323	1,128	1,552	0,271
mmu-miR-379-4373349	30,737	1,296	0,739	2,274	0,272
hsa-miR-33a#-002136	33,753	0,624	0,233	1,668	0,273
mmu-miR-21-4373090	29,643	1,377	0,873	2,173	0,274
mmu-let-7i-4395332	28,702	0,902	0,768	1,060	0,275
mmu-miR-326-001061	33,519	0,633	0,293	1,366	0,278
mmu-miR-328-4373049	30,624	1,208	0,464	3,150	0,280
mmu-miR-433-4373205	32,036	1,130	0,145	8,823	0,288
mmu-miR-1928-121164_mat	34,617	2,016	1,461	2,781	0,289
mmu-miR-487b-001306	30,634	1,409	0,980	2,027	0,290
hsa-miR-196a-241070_mat	24,755	0,849	0,705	1,022	0,295
mmu-miR-431-4395173	31,518	0,748	0,483	1,158	0,296
mmu-miR-320-4395388	27,293	0,820	0,545	1,232	0,301
mmu-miR-301a-4373064	33,191	0,534	0,159	1,795	0,307
mmu-miR-872#-002542	29,561	0,881	0,682	1,139	0,307
mmu-miR-24-2#-002494	27,432	0,843	0,630	1,128	0,309
hsa-miR-425-001104	33,898	0,477	0,173	1,317	0,311
mmu-miR-16-4373121	23,358	1,098	0,819	1,472	0,312
mmu-miR-674#-001956	31,662	0,570	0,183	1,779	0,313
mmu-miR-369-5p-4373195	34,560	0,689	0,094	5,058	0,313
rno-miR-381-4381102	32,278	1,249	0,236	6,593	0,315
mmu-miR-486-4378096	24,911	0,928	0,836	1,030	0,318
hsa-miR-22#-002301	30,789	0,819	0,533	1,257	0,326
mmu-miR-335-5p-4373045	32,789	0,613	0,214	1,761	0,330
mmu-miR-127-4373147	30,550	1,200	0,592	2,434	0,345
mmu-miR-384-5p-4395732	31,856	1,229	0,901	1,674	0,345
mmu-miR-706-001641	31,401	0,809	0,548	1,196	0,347
mmu-miR-130a-4373145	32,508	1,173	0,702	1,961	0,357
mmu-let-7d-4395394	29,358	1,132	0,855	1,499	0,358
mmu-miR-20a-4373286	29,095	1,134	0,785	1,638	0,360
hsa-miR-151-5P-002642	30,628	1,118	0,850	1,471	0,361
mmu-miR-212-002551	30,138	1,454	1,036	2,040	0,367
mmu-miR-409-3p-4395443	32,122	0,751	0,421	1,342	0,369
mmu-miR-196b-4395326	28,456	0,861	0,603	1,228	0,392
mmu-miR-532-3p-4395466	31,467	0,862	0,615	1,208	0,396
mmu-miR-148a-4373130	32,391	1,131	0,672	1,902	0,405
rno-miR-409-3P-002679	31,124	0,841	0,470	1,505	0,414
mmu-miR-26b-4395167	27,075	1,117	0,801	1,558	0,418
mmu-miR-142-3p-4373136	32,328	0,660	0,308	1,417	0,433
mmu-miR-24-4373072	21,359	1,065	0,857	1,324	0,434
mmu-miR-222-4395387	28,512	0,929	0,817	1,057	0,437

hsa-miR-200c-000505	33,184	0,851	0,418	1,735	0,444
mmu-miR-150-4373127	24,490	1,083	0,653	1,794	0,444
mmu-miR-126-5p-4373269	27,248	1,062	0,850	1,327	0,447
mmu-miR-188-5p-4395431	33,791	1,003	0,179	5,622	0,450
mmu-miR-365-4373194	30,746	1,107	0,831	1,475	0,458
mmu-miR-494-4395476	32,534	0,964	0,759	1,225	0,466
mmu-miR-195-4373105	26,140	0,953	0,845	1,075	0,468
mmu-miR-139-5p-4395400	28,439	1,070	0,893	1,283	0,470
mmu-miR-342-3p-4395371	28,323	1,063	0,625	1,810	0,471
mmu-miR-1937b-241023_mat	19,200	1,113	0,531	2,332	0,476
mmu-miR-652-4395463	32,696	0,737	0,328	1,656	0,479
mmu-miR-10b-001181	32,210	0,780	0,248	2,459	0,480
mmu-miR-1274a-121150_mat	23,175	0,820	0,528	1,274	0,484
mmu-miR-27a-4373287	28,760	0,916	0,734	1,143	0,484
mmu-miR-1937c-241011_mat	21,840	1,057	0,472	2,367	0,495
hsa-miR-30e-3p-000422	24,077	1,066	0,900	1,262	0,500
mmu-miR-196a#-002477	36,743	0,116	0,012	1,130	0,502
mmu-miR-218-4373081	31,195	1,113	0,772	1,606	0,502
mmu-miR-503-4395586	32,747	0,738	0,288	1,889	0,504
mmu-miR-467b-001684	33,037	0,630	0,234	1,693	0,520
hsa-miR-378-000567	28,736	0,796	0,476	1,329	0,521
rno-miR-352-001339	30,498	0,851	0,560	1,294	0,521
mmu-miR-99a-4373008	28,923	0,876	0,621	1,234	0,524
mmu-miR-451-4373360	33,303	1,239	0,492	3,124	0,524
mmu-miR-675-3p-4386762	31,710	1,391	0,841	2,301	0,529
rno-miR-7#-001338	29,745	1,057	0,677	1,649	0,537
hsa-miR-30a-3p-000416	23,548	1,065	0,864	1,312	0,539
mmu-miR-15a-4373123	31,436	0,856	0,507	1,447	0,542
mmu-miR-106a-4395589	28,885	1,065	0,804	1,410	0,543
hsa-miR-421-002700	31,761	0,825	0,521	1,307	0,544
mmu-miR-335-3p-4395296	34,718	0,597	0,043	8,312	0,546
mmu-miR-484-4381032	29,321	1,047	0,166	6,582	0,547
hsa-miR-340-000550	33,369	1,564	0,481	5,093	0,551
mmu-let-7e-4395517	27,258	1,072	0,928	1,238	0,553
mmu-miR-592-002017	33,428	0,851	0,420	1,725	0,556
mmu-miR-467F-002886	26,340	1,067	0,678	1,678	0,559
mmu-miR-574-3p-4395460	28,240	1,054	0,639	1,737	0,561
rno-miR-196c-4395750	30,479	1,124	0,688	1,836	0,570
mmu-miR-345-001137	33,053	1,420	0,757	2,664	0,581
mmu-miR-187-4373307	33,347	2,522	0,038	169,020	0,582
mmu-miR-339-5p-4395368	31,886	0,824	0,494	1,374	0,583
mmu-miR-499-4381047	30,896	0,854	0,525	1,390	0,593
rno-miR-190b-4395749	33,842	0,991	0,469	2,092	0,594
mmu-miR-382-4373019	31,617	1,840	0,957	3,540	0,597
mmu-miR-361-4373035	34,096	0,611	0,058	6,440	0,603
mmu-miR-93-4373302	31,333	0,854	0,530	1,376	0,605
mmu-miR-182-4395729	31,939	0,647	0,238	1,762	0,610
hsa-miR-213-000516	34,395	0,708	0,085	5,894	0,614
mmu-let-7g#-002492	34,619	1,362	0,016	114,523	0,614
mmu-miR-190-4373110	33,477	1,020	0,190	5,485	0,615
mmu-miR-199b-001131	34,154	1,349	0,654	2,779	0,627

mmu-miR-181a-4373117	32,040	0,869	0,537	1,405	0,642
mmu-miR-31-4373331	36,162	0,474	0,003	82,451	0,643
mmu-miR-191#-002576	34,894	0,842	0,010	73,003	0,643
mmu-miR-340-3p-4395370	34,619	0,776	0,252	2,386	0,650
mmu-miR-450a-5p-4395414	32,584	0,984	0,256	3,786	0,655
rno-miR-532-5p-4395752	30,795	0,876	0,572	1,342	0,657
mmu-miR-720-001629	23,603	1,067	0,861	1,324	0,668
mmu-miR-744-4395435	32,545	0,883	0,594	1,314	0,674
mmu-miR-181c-4373115	34,829	2,108	0,884	5,027	0,674
mmu-let-7f-4373164	31,013	0,934	0,686	1,273	0,692
hsa-miR-206-000510	17,884	0,965	0,812	1,148	0,698
mmu-miR-29c-4395171	31,131	1,024	0,786	1,335	0,699
mmu-miR-34c#-002584	31,754	0,916	0,394	2,129	0,700
mmu-miR-152-4395170	30,132	0,909	0,589	1,401	0,732
hsa-miR-423-3P-002626	29,796	0,914	0,628	1,332	0,734
mmu-miR-128a-4395327	31,325	1,085	0,679	1,733	0,739
mmu-miR-1839-5p-121135_mat	33,235	0,960	0,691	1,333	0,746
hsa-miR-411#-002238	33,355	1,054	0,804	1,382	0,753
mmu-miR-192-4373108	33,184	0,583	0,070	4,883	0,758
mmu-miR-101a-4395364	32,396	1,067	0,831	1,371	0,779
mmu-miR-323-3p-4395338	32,688	1,232	0,939	1,616	0,781
mmu-miR-466g-241015_mat	33,924	0,738	0,255	2,139	0,782
hsa-miR-189-000488	34,515	0,505	0,003	75,347	0,786
mmu-miR-143-4395360	28,090	1,019	0,796	1,304	0,795
mmu-miR-324-5p-4373052	33,674	0,690	0,097	4,924	0,796
mmu-miR-103-4373158	31,129	1,041	0,544	1,991	0,800
mmu-miR-337-3p-4395662	33,904	0,953	0,306	2,972	0,806
mmu-miR-381-4373020	33,985	0,984	0,000	1,698	0,811
mmu-miR-694-001681	27,641	0,947	0,503	1,782	0,820
mmu-let-7a-4373169	29,992	0,884	0,511	1,527	0,822
mmu-miR-140-4373374	28,042	1,021	0,923	1,129	0,826
mmu-miR-34b-3p-4395748	33,293	0,679	0,052	8,886	0,827
mmu-miR-99b-4373007	30,183	0,972	0,787	1,200	0,830
mmu-miR-541-002562	33,598	0,955	0,426	2,141	0,845
mmu-miR-10a-4373153	31,268	0,927	0,600	1,435	0,850
rno-miR-339-3p-4395760	29,827	0,967	0,619	1,510	0,852
mmu-miR-208b-4395401	32,996	0,942	0,576	1,542	0,861
rno-miR-29c#-001818	33,415	1,313	0,987	1,748	0,861
hsa-miR-106b#-002380	32,412	1,129	0,771	1,655	0,862
mmu-let-7c-4373167	27,642	0,979	0,797	1,202	0,864
rno-miR-664-001323	27,942	1,004	0,817	1,234	0,883
mmu-miR-672-4395438	32,323	1,374	0,780	2,419	0,884
mmu-miR-145-4395389	25,458	0,982	0,820	1,176	0,898
hsa-miR-223-000526	23,888	1,009	0,819	1,243	0,902
mmu-miR-203-4373095	32,742	1,013	0,523	1,962	0,908
mmu-miR-1-4395333	22,408	1,023	0,832	1,259	0,912
hsa-miR-143-000466	31,768	0,902	0,493	1,648	0,915
rno-miR-17-3p-4395779	34,111	1,547	0,536	4,462	0,925
mmu-miR-322-001059	30,588	0,954	0,667	1,364	0,926
mmu-miR-2138-241080_mat	27,902	0,706	0,272	1,829	0,929
mmu-miR-15b-4373122	31,970	0,917	0,515	1,634	0,934

mmu-miR-28-4373067	31,340	0,972	0,628	1,504	0,935
mmu-miR-2134-241120_mat	26,673	0,903	0,485	1,681	0,941
mmu-miR-1193-002794	32,049	1,035	0,492	2,179	0,944
mmu-miR-351-4373345	32,447	0,926	0,514	1,669	0,952
mmu-miR-362-5p-002614	33,366	1,360	0,002	1,218.506	0,953
mmu-miR-27b-4373068	29,981	1,000	0,758	1,319	0,964
mmu-miR-100-4373160	28,951	0,974	0,644	1,474	0,969
mmu-miR-466k-240990_mat	32,718	0,965	0,533	1,746	0,971
mmu-miR-125a-5p-4395309	28,171	0,896	0,474	1,696	0,973
mmu-miR-125b-5p-4373148	27,867	0,973	0,722	1,310	0,974
rno-miR-99a#-002073	32,963	0,833	0,215	3,220	0,981
hsa-miR-22-000398	26,359	0,942	0,572	1,550	0,983
mmu-miR-495-4381078	32,034	0,822	0,368	1,838	0,993

Tabela suplementar 2. miRNAs e seus alvos validados: foram correlacionados os miRNAs diferencialmente expressos em músculo de rato com IC com dados de mRNAs expressos no músculo esquelético. Só são apresentados os alvos que já foram validados para estes miRNAs. Seta ↑: miRNA regulado positivamente; seta ↓: miRNA regulado negativamente.

miRNA	Símbolo Oficial	Nome	Gene ID	Função Geral
miR-27a↑	AIFM1	apoptosis-inducing factor	83533	Fator de indução a apoptose
miR-27a↑	BRD2	bromodomain containing 2	6046	Envolvida com o complexo transcricional e com acetilação de cromatina durante a mitose.
miR-27a↑	CCT4	chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta)	10575	Auxilia no dobramento de peptídeos recém-sintetizados
miR-27a↑	CTSD	cathepsin D	171293	Apoptose mediada por lisossomo
miR-27a↑	DICER1	ribonuclease type III	23405	Processamento de miRNAs
miR-27a↑	FBXW7	F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase	55294	Um das subunidades ubiquitina proteína ligase
miR-27a↑	FOXO1	forkhead box O1	2308	fator de crescimento e diferenciação muscular
miR-27a↑	HIPK2	homeodomain interacting protein kinase 2	28996	Pode atuar como corepressor ou corativador dependendo do fator transcricional associado
miR-27a↑	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	3488	envolvida na sobrevivência, nocrescimento e no desenvolvimento muscular.

miR-27a ↑	LITAF	lipopolysaccharide-induced TNF factor	9516	Induz síntese do fator TNF-a
miR-27a ↑	MEF2C	myocyte enhancer factor 2C	4208	Manutenção do estado indiferenciado de células musculares
miR-27a ↑	ODC1	ornithine decarboxylase 1	4953	Degradação de proteína independente de ubiquitina
miR-27a ↑	POLR2A	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A	5430	Possui domínio fundamental pra atividade da RNA polimerase
miR-27a ↑	POLR2K	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide K	5440	Síntese de mRNA em eucariotos
miR-27a ↑	PTPN12	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	5782	Membro da família proteínas tirosina fosfatase. São sinalizadores moleculares que regulam diferentes processos celulares como: crescimento celular, diferenciação, ciclo mitótico.
miR-27a ↑	RB1	RB1 retinoblastoma 1	5925	Regulador negativo do ciclo celular, estabiliza a cromatina
miR-27a ↑	RXRA	RXRA retinoid X receptor, alpha	6256	Receptor nuclear que media efeito biológico do ácido retinóico.
miR-27a ↑	SP1	Sp1 transcription factor	6667	Fator transcricional envolvido em processos celulares como diferenciação celular, crescimento celular, apoptose, resposta imune, resposta da danos ao DNA, remodelamento da cromatina.
miR-27a ↑	SYNE1	spectrin repeat containing, nuclear envelope 1	23345	forma uma rede de ligação entre organelas e o citoesqueleto de actina para manter a organização espacial subcelular.
miR-27a ↑	MuRF1	tripartite motif containing 63, E3 ubiquitin protein ligase	84676	Importante papel na atrofia
miR-27a ↑	VEGFA	vascular endothelial growth factor A	7422	Aumenta a permeabilidade vascular, induz angiogênese, crescimento celular endotelial e vascular.

miR-29b ↑	AHSA1	activator of heat shock protein ATPase 1	217737	Ativador das heat shock (dobramento e desdobramento de proteínas)
miR-29b ↑	ARCN1	archain 1	372	Envolvido na estrutura ou tráfego de visículas
miR-29b ↑	ARID4B	AT rich interactive domain 4B (RBP1-like)	51742	Diversos processos celulares como: proliferação, a diferenciação, a apoptose, a oncogénese e determinação destino celular
miR-29b ↑	ATP1B1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	481	Proteína de membrana responsáveis por estabelecer e manter o gradiente electroquímico de iões Na e K, através da membrana plasmática.
miR-29b ↑	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	960	Uma glicoproteína da superfície celular envolvidas nas interações célula-célula, a adesão celular e migração.
miR-29b ↑	CDC42	cell division cycle 42	998	controlam diversas funções celulares, incluindo a morfologia celular, a migração, a endocitose e a progressão do ciclo celular.
miR-29b ↑	COL4A2	collagen, type IV, alpha 2	1284	o principal componente estrutural da membrana basal.
miR-29b ↑	DICER1	ribonuclease type III	23405	Processamento de miRNAs
miR-29b ↑	DNAJB11	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 11	51726	Regulam a atividade molecular da chaperona, estimulando a atividade ATPase.
miR-29b ↑	DNMT3A	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha	1788	Codifica uma DNA metiltransferase com função de metilação "de novo" em vez de metilação de manutenção.
miR-29b ↑	FBXW7	F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase	55294	Um das subunidades ubiquitina proteína ligase
miR-29b ↑	FH	fumarate hydratase	2271	componente do ciclo de Krebs cycle, catalisa a formação de L-malato em fumarato.

miR-29b ↑	FOXO1	forkhead box O1	2308	fator de crescimento e diferenciação muscular
miR-29b ↑	HDAC2	histone deacetylase 2	3066	Responsável desacetilação de resíduos de lisina nas regiões N-terminais das histonas.
miR-29b ↑	HSPB6	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6	126393	Possivelmente promove relaxamento do músculo liso
miR-29b ↑	LAMC1	laminin	3915	componente da Lâmina basal
miR-29b ↑	MMP2	matrix metallopeptidase 2	4313	quebra de matriz extra celular
miR-29b ↑	NCOA3	NCOA3 nuclear receptor coactivator 3	8202	um coativador que leva acetilação de histonas tornando o DNA acessível a transcrição
miR-29b ↑	NPM1	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	4869	envolvido em vários processos celulares, incluindo a regulação da via ARF/p53
miR-29b ↑	PAK1	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1	5058	regula a mobilidade e morfologia celular
miR-29b ↑	PDCD4	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	27250	Supressor de tumor, Inibidor do fator 4A1 de tradução em eucarioto
miR-29b ↑	PLK2	polo-like kinase 2	10769	Papel na divisão celular normal
miR-29b ↑	RB1	RB1 retinoblastoma 1	5925	Regulador negativo do ciclo celular, estabiliza a cromatina
miR-29b ↑	SFPQ	splicing factor proline/glutamine-rich	6421	Interage com ubiquitina C
miR-29b ↑	SPEN	Msx2-interacting protein	124461	Proteína reguladora, repressor
miR-29b ↑	SYNE1	spectrin repeat containing, nuclear envelope 1	23345	forma uma rede de ligação entre organelas e o citoesqueleto de actina para manter a organização espacial subcelular.

miR-29b ↑	TGFB3	transforming growth factor, beta 3	7043	envolvida na embriogênese e diferenciação celular
miR-29b ↑	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	8743	Da família do TNF, induz apoptose de células tumorais, parece não ter efeito em células normais
miR-29b ↑	VEGFA	vascular endothelial growth factor A	7422	Aumenta a permeabilidade vascular, induz angiogênese, crescimento celular endotelial e vascular.
miR-29b ↑	ZFP36	ZFP36 ring finger protein	7538	se liga a elementos ricos em AU (AREs) nas UTRs dos mRNAs de algumas citocinas e promove a sua degradação, ex. TNF- α
miR-29b ↑	ZFP36L1	ZFP36 ring finger protein-like 1	677	Regula fatores de crescimento
miR-214 ↓	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	11475	é normalmente utilizado como um marcador de formação de miofibroblastos
miR-214 ↓	ATP2A2	Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	488	ATPase, Ca ⁺⁺ dependente, de contração lenta
miR-214 ↓	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	960	Uma glicoproteína da superfície celular envolvidas nas interações célula-célula, a adesão celular e migração.
miR-214 ↓	CDC42	cell division cycle 42	998	controlam diversas funções celulares, incluindo a morfologia celular, a migração, a endocitose e a progressão do ciclo celular.
miR-214 ↓	CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	1499	Adesão célula-célula
miR-214 ↓	DICER1	ribonuclease type III	23405	Processamento de miRNAs
miR-214 ↓	GPD1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	14555	Papel fundamental no metabolismo de carboidratos e gorduras
miR-214 ↓	HDGF	hepatoma-derived growth factor	3068	atividade mitogênica e de ligação ao DNA e pode desempenhar um

				papel na proliferação e diferenciação celular.
miR-214 ↓	ITGB1	integrin	3688	Adesão celular, reparo tecidual, homeostase
miR-214 ↓	JUN	jun proto-oncogene	3725	Correlacionada com proliferação celular, diferenciação e transformação.
miR-214 ↓	MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1	4170	aumenta a sobrevivência celular, e inibe apoptose
miR-214 ↓	PAK1	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1	5058	regula a mobilidade e morfologia celular
miR-214 ↓	TGFBR2	transforming growth factor, beta receptor II	7048	Receptor de TGF-β
miR-214 ↓	VEGFA	vascular endothelial growth factor A	7422	Aumenta a permeabilidade vascular, induz angiogênese, crescimento celular endotelial e vascular.
miR-214 ↓	XBP1	X-box binding protein 1	7494	produz factor de transcrição que regula os genes do MyHC da classe II
miR-214 ↓	ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1	6935	inibe a transcrição da interleucina II
miR-214 ↓	ZEB2	zinc finger E-box binding homeobox 2	9839	ação repressora ao se ligar ao DNA, interage com SMADs ativadas
miR-489 ↓	CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	1027	Controle da progressão do ciclo celular em G1
miR-489 ↓	PTPN11	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	5781	regular uma variedade de processos celulares incluindo o crescimento celular, diferenciação, ciclo mitótico, e transformação oncogênica
miR-539	LRPAP1	low density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1	104225	
miR-539	MITF	microphthalmia-associated transcription factor	4286	
miR-632 ↓	DICER1	ribonuclease type III	23405	Processamento de miRNAs

miR-632 ↓	PRDX6	peroxiredoxin 6	9588	pode reduzir a H ₂ O ₂ e da cadeia de ácido graxos curtas, e os hidroperóxidos de fosfolípidos.
miR-146b ↓	NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	4790	regulador de transcrição que é ativado por vários estímulos intra-e extracelular, tais como as citocinas, os radicais livres do oxigênio, irradiação ultravioleta, e produtos bacterianos ou virais.

Tabela suplementar 3. miRNAs e seus alvos preditos: Os alvos preditos para estes miRNAs foram confrontados com dados de mRNA expressos em condições normais no músculo esquelético.

miR-27a	miR-29b	miR-214	miR-434	miR-489	miR-539	miR-632	miR-146
PPP1CC	LPL	EDF1	Stat3	TANK	DDX5	PADI2	Tnfrsf22
PDHX	ZFP36L1	MAPRE1	Slc38a2	CCT6A	DNAJB4	TANK	Sepp1
RPS6KA5	NFIA	GORASP2	Bin1	ZFR	CCDC47	MAN2A2	Rgn
RMND5A	HMG3	HDLBP	Tcea3	FBXO40	MARCH7	ATP1A2	Tnrc6b
GRSF1	RLF	CLINT1	Rad23b	SMARCA1	RAD50	EEF2	Rell1
TLK2	DNMT3A	NARG1	Hspa4	ADAM9	ZNF330	NFE2L1	Tnfsf4
TEAD1	CSDA	PATL1	Serping1	BRWD1	MAP3K2	ST13	Cdk14
SMARCA1	SVIL	CPEB4	Morf4l2	NCOA3	CSE1L	MYH11	Smad4
NPEPPS	MORF4L1	KPNA3	Ube2g1	MAT2A	NFIA	GYG1	Acer2
FN1	LAMC1	ZFAND3	Gyg1	MYPN	PARP1	MRPS9	Tnfrsf23
RCAN2	EIF4E2	RBX1	Nbr1	C14orf166	TMEM131	USP28	Nos1ap
UBR5	RMND5A	HMG3	Lpl	NFIL3	FBXO30	EIF3J	Zfp329
GTF2I	ANK3	USP15	Ywhaz	ATP5F1	LMAN1	RBM25	Smarcd1
JMJD1C	WDR26	RAB14	Acsl4	TAX1BP1	RAB5A	EZR	Ahrr
PLK2	FOS	NUFIP2	Txnrd1	PEBP1	ZFP106	KPNA4	Lfng
C5orf41	FEM1B	UBE2R2	Cdkn1b	PDE4D	FKBP5	KPNA1	Phyh
ATP1A2	PMP22	SENP2	Dnajb11	SCARB2	HSPE1	CPEB4	Prkch
CIRBP	AKAP13	BTBD1	Abra	MTUS1	FLNC	C1orf43	Kras
USP25	SUV420H1	PPP1R1A	Fkbp1a	LPL	BLCAP	PRPF3	Zfp775
STBD1	ELF2	EIF4G1	Map1lc3b	MITF	CD36	BAZ2B	Vma21
LCOR	COL4A2	ACSL1	Azin1	SHOC2	ARID5B	SEC23A	Itgb6
NDUFS4	IREB2	KIF1B	Errfi1	MSN	DDX17	UBR5	Il17a
SRL	REV3L	QKI	Arid4b	DDX47	KIF1B	ME2	Hrasls
VEGFB	TRIM63	NRBP1		BPTF	RAD23B	UBAP1	Axin2

miR-27a	miR-29b	miR-214	miR-434	miR-489	miR-539	miR-632	miR-146
FOXO1	ATP1B1	EIF5B		ELF1	RNPS1	SMAP2	Hoxa11
MARCH7	YWHAE	CHMP4B		ZMYND8	PFDN2	CRKL	Neto2
YWHAB	SFPQ	MARCH6		NRIP1	MYO18B	APOL2	Tnpo1
AFF4	PSMD7	NDUFC2		SMC1A	ARL8B	VCAN	Eif2s3x
NARG1	PTP4A1	KIAA1737		ATP2B1	PHF3	SMAD4	Sema4f
C7orf41	QKI	PCBP2		C15orf24	ARPP-21	MAPK1	Zfp317
ANK3	NRBP1	YWHAZ		ST3GAL3	TBC1D4	CASC3	Mesdc2
NR1D2	SCHIP1	PIM1		KIAA1715	MARCH6	HDAC2	Eya2
PLCL2	VCL	C11orf10		PIK3C3	FGB	TLK1	Ikbkg
NEDD4	VEGFA	ABCC5		KIAA0564	SCARB2	ADAM10	Zbtb4
CNOT1	ARRDC3	MEF2D		GNB1	MGEA5	CTGF	Cybas3
HINT3	KPNA4	GMPR		MXI1	RHOQ	KCTD12	Cox7a2l
C8orf4	RERE	TRIP10		ANKRD28	HNRNPL		Pcdhb22
MED13L	SPARC	MACF1		RPL28	STRAP		Fgf16
WSB1	PSME4	EFHD1		MAPRE3	CUL3		Pard3
TROVE2	COL6A3	NRIP1		RAB14	PJA2		
ZNF577	PDHX	VEZT		MAPK1	IWS1		
ATP2B1	FSTL1	CUL2		ZC3H6	AHSA1		
ZFP36	PRKAB2	NCKAP1		SEL1L	EIF3J		
NFE2L2	PPP2CA	PUM1		NCBP2	PAPOLA		
WDR43	DNAJB11	MAN2A2		ERGIC2	NARS		
INSR	TSC22D3	PPTC7		NUDT21	SLC25A46		
UBE2K	TGFB3	TEX2		PAF1	PNRC2		
DNAJC13	PLEKHA1	GBF1		UBFD1	RPS6KA3		
C1orf21	SEC23A	ZEB2		CLK4	DDX21		

miR-27a	miR-29b	miR-214	miR-434	miR-489	miR-539	miR-632	miR-146
OPA1	NASP	UBE4B			UBE2H		
ANK1	SMARCC1	SMARCC1			ZFX		
TMSB10	MXI1	C1orf128			FBXO3		
MYH9	LAMA2	RPL28			MAPRE1		
ZZZ3	OSBPL11	CRKL			SMC5		
FBXW7	BIRC6	EXOC4					
SP1	MAT2A	CASC3					
	MAP2K6	BNIP2					
	DYM	RALBP1					
	BTG2	TGOLN2					
	COMMD2	CLASP1					
		SEC24C					