

REGULAÇÃO DA OSTEOLICINA PELO MICRORNA MIR-155 DURANTE A MIOGÊNESE

PAULA PACIELLI FREIRE

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada - BGA
Área de concentração: Biologia celular estrutural e funcional

Orientador: Robson Francisco Carvalho

**BOTUCATU
2016**



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

REGULAÇÃO DA OSTEOLICINA PELO MICRORNA MIR-155 DURANTE A MIOGÊNESE

PAULA PACIELLI FREIRE

ORIENTADOR: ROBSON FRANCISCO CARVALHO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada - BGA
Área de concentração Biologia celular estrutural e funcional

Orientador: Robson Francisco Carvalho

**BOTUCATU
2016**

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

Freire, Paula Paccielli.

Regulação da osteoglicina pelo microRNA miR-155 durante a miogênese / Paula Paccielli Freire. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Robson Francisco Carvalho

Coorientador: Maeli Dal Pai

Capes: 20601000

1. Expressão gênica. 2. Músculos - Regeneração. 3. Células - Cultura e meios de cultura. 4. Mioblastos esqueléticos. 5. MicroRNAs. 6. Osteoglicina.

Palavras-chave: MicroRNA miR-155; Miogênese; Osteoglicina.

Dedicatória

A minha mãe, Silvia, pela constante presença
em minha vida. Nos momentos mais difíceis
me carregou no colo, me aguentou pacientemente,
me amou muito e me ensinou a amar.

Ao meu pai, Valter, responsável por toda minha jornada,
me ensinou a importância da busca pelo conhecimento,
a importância do trabalho, me estimulou, acreditou em mim
e se esforçou para que tudo isso pudesse acontecer um dia.

Eu amo vocês.

Agradecimento Especial

A Deus, por nunca desistir de mim, por sempre me perdoar,
por sempre me dar forças e perseverança,
por sempre me proteger de todo mal,
por me iluminar e fazer de mim quem eu sou.
Que onde quer que eu esteja sinta o teu amor a me guiar.

“Dai-me Senhor, a perseverança das ondas do mar,
que fazem de cada recuo um ponto de partida para um novo avanço.”

(Gabriela Mistral)

*- Deus, se algum dia eu estiver prestes a perder as esperanças,
me ajude a lembrar que os teus planos são maiores que os meus sonhos.*

Agradecimento

Ao Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho, grande amigo e orientador.

Agradeço por ter me confortado durante o meu choro, por dividir comigo minhas angústias e por acreditar que eu seria capaz apesar de todos os meus “mimimis”.

Obrigada pelos grandes ensinamentos sobre a vida!

“Talvez não tenha conseguido o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser mas graças a Deus não sou o que eu era antes.”

(Marthin Luther)

Serei eternamente grata por ter me acolhido durante a minha graduação, por abrir as portas deste laboratório e dar-me liberdade para conduzir os nossos experimentos.

Agradeço também por toda a confiança e reconhecimento,

sem os quais eu não chegaria até aqui.

Muito obrigada!

Agradecimentos

Aos meus pais *Silvia* e *Valter*, por terem me apoiado durante toda minha jornada acadêmica, por estarem sempre presentes e pela paciência que tiveram durante todos os meus momentos difíceis. Peço desculpas pelos dias em que não fui boa filha. Obrigada por terem acreditado em mim e por me amarem tanto como vocês me amam!

A minha irmã, *Carolina*, por ter me dado o maior tesouro dessa vida, minha sobrinha *Beatrice*, por ser um exemplo de mãe-guerreira e por sempre estar presente em minha vida. Eu amo você.

Ao meu irmão *José Vitor*, mesmo distante me ensinou a ter muita força e coragem. Admiro muito o seu caráter e sua coragem para seguir o caminho do seu coração. Um dia quero ter essa mesma coragem. Também amo muito você.

A minha sobrinha *Beatrice*, raio de luz das nossas vidas, obrigada por ter vindo ao mundo e ter trazido tanta felicidade ao meu coração minha princesa mais linda.

A minha co-orientadora, *Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva*, grande professora e grande mãe. Agradeço muito por sua participação durante todo esse trabalho, pela atenção que dedicou durante minha qualificação, por acreditar no meu potencial e por todos os ensinamentos. Sempre será um exemplo de mulher e professora para mim.

Ao meu eterno orientador, *Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna*, por ter despertado em meu coração a paixão pela pesquisa. Agradeço a Deus por ter colocado o senhor em minha vida, para ensinar a beleza e a importância dos estudos. Seus ensinamentos ficarão guardados em meu coração para sempre. Sou encantada pelo seu jeito de aprender ensinando. Muito obrigada por me apresentar esse mundo. “Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.” (Cora Coralina)

A toda minha *Família*, pelo amor incondicional e atenção, pelos encontros, conversas e risadas, em especial avó *Helena*, avô *José, Alexandre, Ângelo, Décio, Edemar, Felipe, Gabriela, Jana, Karina, Leandro, Luana, Maike, Mário, Mayara, Melissa, Niciene, Vitor, Sâmia e Súria*. Agradeço as minhas tias *Cecília, Nanci e Verginia*, por serem exemplos de mulheres em minha vida, por terem me ajudado a crescer e por serem tão atenciosas comigo. Obrigada por terem me ensinado a ter garra e ter o maior amor do mundo por minha família. Vocês são grandes mulheres.

A minha tia *Denise*, por sempre ser tão carinhosa comigo e me amar tanto, apesar da minha ausência.

A *Selma, Marcos, Daniel e Carolina* por estarem presentes durante todo esse período acadêmico, pelo amparo, por todo amor, carinho e paciência.

A *Grasieli*, grande amiga que dividiu comigo todos os sentimentos despertados durante um trabalho de mestrado. Agradeço por toda sua contribuição nessa dissertação, por toda atenção que dedicou a nossa amizade e por ter me ajudado a evoluir durante essa etapa. “Amizade que surge em meio à luta é eterna!”

Aos meus amigos, colegas de laboratório e de departamento *Ana Omoto, Ana Carolina Camargo, Bianca Gonçalves, Brenda Minatel, Bruno Duran (querido amigo “Bos”), Bruno Fantinati, Bruno Martinucci, Carlos Alves (eterno companheiro), Edson Mareco, Flávia Constantino, Helga Nunes, Ivan Vechetti, Joyce Zalotti, Juarez Ferreira, Ketlin Colombelli, Rafaela Nunes (grande amiga), Rondinelle Salomão, Sérgio Alcantara dos Santos, Tassiana Gutierrez, Veridiana Carvalho, Viviani Sene e Warlen Pereira*, obrigada por me ajudarem durante os experimentos, por terem se tornado meus amigos, pela convivência, companheirismo e por me apoiarem nos momentos fáceis e difíceis.

As alunas de iniciação científica *Bruna Zanella, Caroline Bredariol, Francielle Mosele, Jéssica Valente e Jéssica Bindo*, obrigada por toda participação, alegria e apoio dentro do laboratório, vocês possuem muito potencial e são o futuro do nosso grupo. Em especial, agradeço muito a aluna *Sarah Cury*, que se dedicou, participou integralmente desse trabalho e se tornou uma grande amiga durante esse período. Agradeço imensamente!

Aos amigos *Geysson* e *Leonardo* por todos os ensinamentos, pelas críticas e conselhos. Vocês contribuíram muito para a evolução e desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos da Clínica Médica, *Caroline Mazetto*, *Danielle Vileigas*, *Danielle Tomaz*, *Dijon Campos*, *Loreta Tomasi*, *Paula Grippa* e *Vitor Loureiro* por todo apoio e por dividirem comigo os sentimentos causados pelo temido *Western Blot*.

As amigas *Jéssica*, *Maria*, *Taina* e *Vanessa*, pela amizade, pelos conselhos, pelas viagens inesquecíveis, por renovarem minhas energias sempre que precisei e por terem compartilhado comigo todo esse momento.

As amigas *Camila*, *Claudia*, *Heloisa*, *Marcela* e *Mariane*, pela amizade, pela companhia e por terem me apoiado durante a graduação e durante o mestrado.

Aos membros da banca de qualificação e banca de defesa, *Profa. Dra. Maeli Dal Pai*, *Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho*, *Prof. Dr. Renato Ferretti*, *Profa. Dra. Valéria Cristina Sandrim* e *Profa. Dra. Marina Politi Okoshi* pelos valiosos conselhos e sugestões para a melhoria dessa dissertação e para a elaboração do artigo.

A *Prof. Dr. Edna Kimura* por abrir as portas de seu laboratório, dar-me liberdade para realizar o experimento de luciferase e agradecer seu aluno *Dr. César Fuziwara* por todos os ensinamentos e paciência.

A todos os docentes do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu, em especial a *Profa. Dra. Flávia Delella*, pelo apoio durante os experimentos com cultura celular, por ser tão dedicada e se esforçar para manter sala de cultura organizada.

A todos os funcionários do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu, que contribuíram em todos os momentos desse trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2014/13783-6 e nº 2012/13961-6) pela bolsa e auxílio financeiro concedidos.

A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu nunca deixe de caminhar.

(Eduardo Galeano)

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
1. Introdução	7
1.1. Eventos celulares e moleculares da miogênese	7
1.2. Controle da miogênese pelo secretoma do músculo esquelético	9
1.3. Osteoglicina	11
1.4. MicroRNAs e a regulação da expressão gênica.....	12
1.5. MicroRNAs músculo específicos e miogênese.....	15
2. Objetivos.....	19
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. Material e Métodos	20
3.1. Cultura Celular.....	20
3.1.1. Delineamento Experimental	21
3.2. Transfecção Celular	22
3.2.1. Miméticos do miR-155 (miR 155- <i>mimic</i>)	22
3.2.2. Inibidores do miR-155 (miR 155- <i>inhibitor</i>).....	23
3.2.3. Silenciamento gênico pós-transcricional da osteoglicina (Ogn)	23
3.3. RT-qPCR	24
3.3.1. Extração do RNA	24
3.3.2. Integridade do RNA.....	25
3.3.3. Reação de Transcrição Reversa (síntese de cDNA)	25
3.3.4. PCR Quantitativo em Tempo Real	25
3.4. Ensaio de Migração – <i>Wound Healing</i>	28
3.5. Ensaio de Proliferação	28
3.6. <i>Western Blot</i>	29
3.6.1. Extração proteica	29
3.6.2. Eletroforese e <i>Immunoblotting</i>	30
3.7. Ensaio de Luciferase	33
3.7.1. Busca on-line por alvos preditos do miR-155	33
3.7.2. Construção dos vetores pmiRGlo-Ogn 3'UTR-wt e -Mut	33

3.7.3. Ensaio de gene repórter Luciferase	36
3.8. Imunofluorescência.....	37
3.9. Análise estatística dos dados.....	39
4. Resultados	40
4.1. Extração e análise da qualidade do RNA.....	40
4.2. Regulação Pós-transcricional da Ogn pelo miR-155	41
4.3. miR-155 e Ogn desregulam marcadores moleculares da miogênese.....	45
4.3.1. Análise de expressão gênica	45
4.3.2. Análise dos níveis proteicos	47
4.4. miR-155 diminui a migração dos mioblastos C2C12	51
4.5. miR-155 e Ogn diminuem a proliferação das células C2C12	54
4.6. miR-155 inibe a diferenciação de células C2C12.....	56
5. Discussão	58
6. Conclusões	63
7. Referências	64
8. Material Suplementar	73
9. Publicações e Prêmios	79

Lista de Figuras

Figura 1. Principais processos da miogênese.....	7
Figura 2. Expressão gênica durante a miogênese	9
Figura 3. Biogênese e principais mecanismos de ação dos miRNAs	15
Figura 4. Delineamento experimental para as análises funcionais do miR-155 e Ogn durante a miogênese	22
Figura 5. Construção dos plasmídeos pmiRGlo-Ogn-3'UTR-wt e -Mut para ensaio de gene reporter	35
Figura 6. Ensaio de <i>Gene Reporter Luciferase</i> para a validação funcional de alvos de miRNAs	37
Figura 7. Expressão da Ogn e do miR-155 na diferenciação de células C2C12	42
Figura 8. Identificação do sítio funcional de pareamento entre a Ogn e o miR-155	43
Figura 9. Regulação pós-transcricional da Ogn pelo miR-155 na miogênese	44
Figura 10. Ogn e miR-155 desregulam os fatores transcricionais da miogênese e o marcador molecular da diferenciação	46
Figura 11. miR-155 altera os níveis de expressão proteica da Myh2 e Ogn na miogênese	48
Figura 12. Inibição do miR-155 não altera os níveis de expressão proteica de Ogn, Myod, Myog e Myh2 na miogênese	49
Figura 13. Efeito do <i>knockdown</i> da Ogn nos níveis de expressão proteica de Myod, Myog e Myh2 na miogênese	50
Figura 14. miR-155 diminui a migração dos mioblastos C2C12	52
Figura 15. miR-155 e Ogn diminuem a taxa de proliferação de mioblastos C2C12	55
Figura 16. miR-155 altera formação de miotubos na miogênese	57

Lista de Tabelas

Tabela 1. Genes e sequências dos iniciadores utilizados na RT-qPCR	27
Tabela 2. Anticorpos primários utilizados para o ensaio de <i>Western Blot</i>	32
Tabela 3. Alterações morfológicas nos miotubos	56

Regulação da osteoglicina pelo microRNA miR-155 durante a miogênese.

A miogênese é um processo altamente orquestrado em que células musculares precursoras mononucleadas, os mioblastos, proliferam e diferenciam-se para formação de fibras musculares adultas. Durante a diferenciação, os mioblastos encerram o seu ciclo celular, migram para regiões predeterminadas, alinham-se uns com os outros e, subsequentemente, fundem-se para finalmente se transformarem em miotubos multinucleados. Trabalhos recentes demonstraram que o processo de miogênese é altamente sensível e regulado por moléculas presentes no meio extracelular. Experimentos realizados com células musculares esqueléticas C2C12 identificaram a proteína osteoglicina (Ogn) como uma importante proteína secretada pelo músculo que apresenta um aumento de expressão durante a miogênese. Entretanto a regulação pós-transcricional da Ogn por microRNAs durante a miogênese ainda é desconhecida. Análises de bioinformática identificaram a Ogn como um possível alvo do microRNA miR-155. Neste trabalho, nós testamos a hipótese de que o miR-155 inibe a expressão da Ogn controlando a miogênese esquelética. Ensaio de luciferase, RT-qPCR e Western Blot confirmaram que o miR-155 inibe a tradução da Ogn pela ligação na região 3'UTR da Ogn. A transfecção do miR 155-*mimic* promoveu diminuição na expressão do marcador molecular de miogênese Myh2 e aumento da expressão do fator transcricional Myog; além disso, a transfecção de miR155 diminuiu a migração e proliferação dos mioblastos, além de diminuir a formação dos miotubos. O *knockdown* da Ogn, por siRNA, diminuiu a expressão gênica dos marcadores moleculares miogênicos Myh2, Myod e Myog nos miotubos e assim diminuiu a proliferação dos mioblastos. Nossos resultados indicam que Ogn é um alvo direto do miR-155 e sugerem uma nova via de regulação da miogênese, na qual o miR-155 inibe a Ogn diminuindo os processos de proliferação, migração e diferenciação dos mioblastos C2C12.

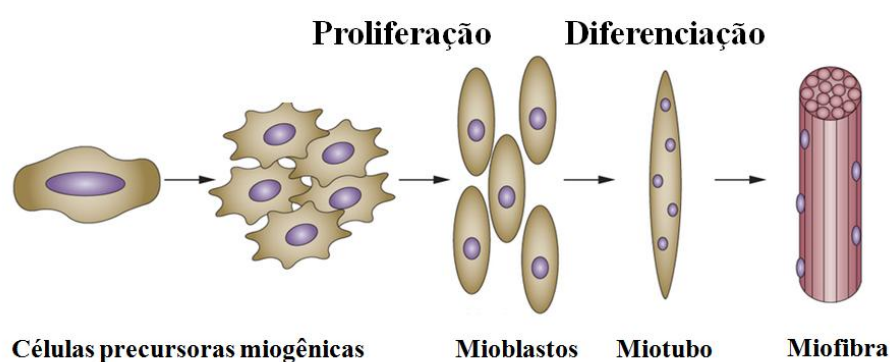
Posttranscriptional regulation of osteoglycin by microRNA miR-155 during myogenesis

Skeletal myogenesis is a highly regulated process in which mononucleated precursor cells, the myoblasts, undergo proliferation and differentiation. Upon differentiation, the cells withdraw from the cell cycle, migrate, align with each other, and subsequently fuse to form terminally differentiated multinucleated myotubes. Myogenesis is a well-characterized program of cellular differentiation sensitive to autocrine and paracrine signaling events. Previous reports have identified the protein osteoglycin (Ogn) as an important component of the skeletal muscle secretome that is differentially expressed during muscle development. However, the posttranscriptional regulation of osteoglycin by microRNAs during myogenesis is completely unknown. Bioinformatics analysis showed that miR-155 potentially targeted Ogn transcript at region 3' UTR. In the present study, we tested the hypothesis that miR-155 inhibits Ogn expression to regulate skeletal myogenesis. Luciferase assay, RT-qPCR and Western blot analyses confirmed that miR-155 regulates Ogn at 3'UTR region. The differential expression of miR-155 correlates with the differential expression of myogenic molecular markers Myh2 and Myog; moreover, the miR-155 transfections decreased cellular migration and proliferation in myoblasts, and decreased myotubes formation. The Ogn *knockdown* deregulates the expression of myogenic molecular markers Myh2, Myod, and Myog mRNA expression in myotubes and decreased myoblasts proliferation. These results reveal a novel pathway in which miR-155 inhibits Ogn expression to regulate migration, proliferation and differentiation during myogenesis.

1. Introdução

1.1. Eventos celulares e moleculares da miogênese

Em mamíferos, a miogênese é o processo de desenvolvimento embrionário do tecido muscular esquelético que, a nível molecular, é regulado pela interação de transdutores de sinais intracelulares e fatores de transcrição nucleares¹. Durante o desenvolvimento do músculo esquelético, as células dos somitos comprometem-se à linhagem miogênica e progridem ao longo da via miogênica através de eventos celulares de proliferação e diferenciação terminal e, posteriormente, formação das miofibras multinucleadas. Durante esses processos, há a ativação dos fatores de regulação miogênicos (MRFs), incluindo as famílias MyoD e MEF2, resultando numa reprogramação da expressão gênica responsável pelo controle da miogênese esquelética²⁻⁴.



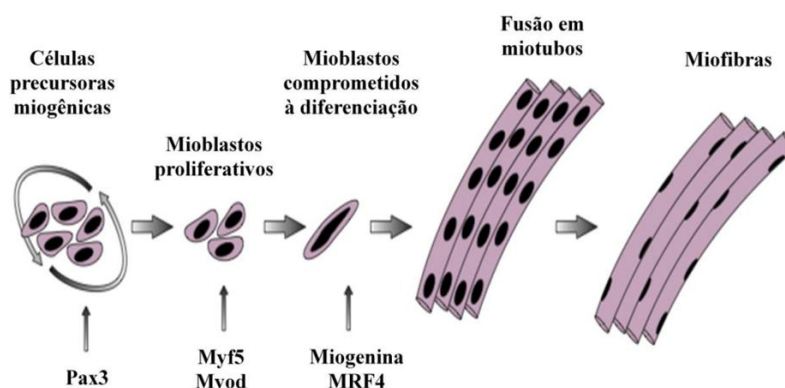
Adaptado de Salvatore et al. 2014⁵.

Figura 1. Principais processos da miogênese. Células musculares precursoras mononucleadas, os mioblastos, proliferam e diferenciam-se para formação de fibras musculares adultas. Durante a diferenciação, os mioblastos saem do ciclo celular, migram para regiões pré-determinadas, alinham-se uns com os outros e, subsequentemente, fundem-se para finalmente se transformarem em miotubos multinucleados.

A determinação e a diferenciação terminal das células musculares ocorrem a nível transcricional governadas pelas vias regulatórias de quatro MRFs: *myogenic factor 5* (Myf5), *muscle-specific regulatory factor 4* (MRF4; também conhecido como MYF6), *myoblast determination protein* (Myod) e miogenina⁶. Os MRFs possuem dois domínios principais, um envolvido na ligação com a molécula de DNA e outro envolvido na dimerização com proteínas E (E12 ou E47)⁷. O heterodímero formado possui alta afinidade por uma sequência específica do DNA (5'-CANNTG-3'), conhecida como *E-box*⁷. Essa sequência está presente na região promotora de genes músculo-específicos e a ligação é responsável pela ativação da transcrição desses genes^{1,8}. Esses MRFs são os responsáveis pela indução de células precursoras musculares mononucleadas, os mioblastos, à proliferação e à diferenciação^{1,9,10}.

No processo de diferenciação do músculo esquelético, o comprometimento das células somáticas do mesoderma com a linhagem miogênica é marcado pela expressão da Myf5 e Myod; essas células da linhagem miogênica em proliferação são então denominadas de mioblastos⁴. Embora a Myod e o Myf5 definam a identidade dos mioblastos, as células precursoras somáticas devem ser pré-comprometidas com a linhagem miogênica antes da expressão dos MRFs. No embrião, esse pré-comprometimento é realizado pelo fator transcricional *paired-box 3* (Pax3), o qual é expresso em células do mesoderma pré-somítico e dos primeiros somitos epiteliais^{11,12}. No dermomiótomo, as células precursoras, que apresentam expressão de Pax3 induzida por sinais secretados pelo mesoderma da placa lateral e pelo ectoderma superficial, são mantidas como uma população não diferenciada e em proliferação; contribuindo assim para a expansão das células da linhagem miogênica¹³. Os mioblastos que saem do ciclo celular, que expressam Myf5 e Myod, tornam-se miócitos diferenciados e iniciam a

expressão da miogenina e do MRF4, os quais regulam a diferenciação dessas células em fibras musculares⁴.



Adaptado de Chargé and Rudnicki 2004¹⁴.

Figura 2. Expressão gênica durante a miogênese. Células precursoras miogênicas começam a expressar Pax3 contribuindo para a expansão das células miogênicas. Após a indução de Myf5 e/ou Myod, as células somíticas mesodermiais são comprometidas com a linhagem miogênica (mioblastos) iniciando a proliferação dos mioblastos. A expressão de miogenina e MRF4 induz a diferenciação dos mioblastos em miotubos. Posteriormente, os mioblastos se fundem para originar os miotubos multinucleados e subseqüentemente miofibras maduras.

1.2. Controle da miogênese pelo secretoma do músculo esquelético

Embora os fatores intracelulares que controlam a miogênese já estejam bem caracterizados, o conhecimento sobre os fatores extracelulares secretados pelas células musculares que regulam o ciclo celular e induzem o processo de diferenciação ainda é bastante escasso. No entanto, evidências mostram que a miogênese é extremamente sensível ao meio extracelular^{15,16} e o músculo esquelético pode funcionar como órgão endócrino por secretar fatores extracelulares que regulam seu desenvolvimento¹⁷. Tendo em vista a importante atuação dos componentes secretados pelas células musculares esqueléticas (secretoma), torna-se necessário uma melhor compreensão da regulação desses componentes para elucidar as interações entre mecanismos autócrinos e

intracelulares de regulação envolvidos na miogênese e crescimento do tecido muscular esquelético.

Recentemente, Chan *et al.* 2011¹⁸ identificaram 34 proteínas como parte dos componentes do secretoma e, dentre elas, 30 são reguladas diferencialmente durante a miogênese¹⁸. Nesse trabalho, a osteoglicina (Ogn) foi a proteína que apresentou um aumento na sua expressão do seu transcrito (mais de 6 vezes) durante o processo de miogênese. Os autores também avaliaram o nível de expressão da proteína Ogn nos estágios da miogênese mioblastos e miotubos, e encontram uma discrepância na expressão da Ogn nessas duas fases. Além disso, quando realizaram o *knockdown* da Ogn, verificaram uma diminuição na diferenciação dos mioblastos, comprovada pela diminuição de 1,6 vezes na atividade transcricional da quinase creatina muscular, um marcador da diferenciação muscular. Esses dados indicam que a Ogn é uma importante proteína secretada pelo músculo e que influencia os estágios iniciais da miogênese. Os autores observaram que o tratamento de osteoblastos com meio de cultivo de mioblastos com ganho e perda de função da Ogn, aumenta e diminui, respectivamente, os níveis de expressão proteica da fosfatase alcalina, do colágeno do tipo 1 e da β -catenina nos osteoblastos. Esses resultados indicam que a Ogn, produzida no músculo, também atua como um importante fator humoral anabólico fundamental para o desenvolvimento dos osteoblastos¹⁹.

Os dados sobre os níveis gênicos e proteicos da Ogn no músculo esquelético ainda são muito escassos. Entretanto, uma análise do perfil de expressão gênica da Ogn utilizando a ferramenta *Gene Expression Omnibus (GEO Profile* ²⁰) realizada em nosso laboratório nos forneceu importantes informações sobre seu transcrito no músculo esquelético e em células musculares da linhagem C2C12. Essa ferramenta permitiu o acesso de dados de expressão gênica da Ogn armazenados no *GEO profile*. Essa

pesquisa inicial utilizou os seguintes parâmetros para filtro dos dados: 1) Ogn no músculo esquelético (“*skeletal muscle*” and Ogn, ou C2C12 and Ogn) e 2) Ogn com expressão diferencial (“*up down genes*”[filter]). Para a busca utilizando os termos “*skeletal muscle OGN AND "up down genes"*[filter]”, encontramos 17 resultados (link em <http://goo.gl/N9OLrA>, atualizado em 20/01/2016) demonstrando alteração da expressão da Ogn e, dentre os perfis desses dados obtidos, destacam-se os relacionados com miogênese, depleção da miostatina, distrofia muscular de Duchenne e regeneração muscular. Para a busca utilizando os termos “C2C12 OGN AND “*up down genes*”[filter]”, encontramos 6 resultados (link em <http://goo.gl/H3J2K4>), atualizado em 20/01/2016) demonstrando uma alteração da Ogn e, dentre os perfis de dados obtidos, destacam-se os relacionados com diferenciação de miotubos *in vitro*, efeito da reversina em mioblastos, restrição de nutrientes no desenvolvimento dos miotubos e efeito do piruvato nas células musculares. Esses dados ainda não explorados sugerem que a Ogn desempenha uma função ainda não descrita em processos como miogênese, regeneração e nas distrofias musculares.

1.3. Osteoglicina

A Ogn, originalmente chamada de fator osteoindutivo e, mais tarde, renomeada de mimecan / osteoglicina^{21,22}, é o sétimo membro pertencente à família dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRPs) que são secretados na matriz extra-celular²². Sua estrutura proteica é composta por 6-11 de repetições ricas em leucina e possui um peso molecular entre 25 a 60 kDa²³. O gene *Ogn* está localizado no cromossomo 9q22 humano e no cromossomo 13A5 em camundongos; sua estrutura genômica é altamente conservada entre as espécies. Na espécie humana, uma única cópia do gene dá origem a múltiplos transcritos de mRNA resultantes do *splincing* alternativo de poliadenilação

diferencial²⁴. Em camundongos, diferente da espécie humana, o gene *Ogn* origina um único transcrito. No entanto, todos esses transcritos produzem uma proteína idêntica que é conservada entre as espécies, indicando a sua importância funcional²⁴⁻²⁶. A principal função da *Ogn* já descrita está relacionada com a fibrilogênese do colágeno de tecidos conjuntivos e matrizes ósseas^{23,26,27}.

Além de sua associação com a fibrilogênese do colágeno, a *Ogn* também foi associada com o processo de senescência celular em fibroblastos cardíacos²⁸. Os autores identificaram o microRNA miR-22 como possível regulador da *Ogn* e realizaram ensaio funcional desse miR-22 e *Ogn* no desenvolvimento de fibroblastos cardíacos. Esse trabalho demonstrou a regulação da *Ogn* pelo miR-22 em fibroblastos de ratos neonatais e adultos e concluiu que essa regulação resulta em um aumento da senescência dessas células²⁸.

Embora a *Ogn* já tenha sido identificada como parte do secretoma de células musculares¹⁸, ainda não foi avaliado a sua função nos processos de proliferação, migração e diferenciação das células musculares. Além disso, é provável que existam outros microRNAs que regulam pós-transcricionalmente a expressão da *Ogn* durante os no músculo esquelético; os microRNAs são elementos-chaves no controle do desenvolvimento do músculo esquelético e sua desregulação está envolvida na origem e progressão de várias doenças do músculo²⁹⁻³¹.

1.4. MicroRNAs e a regulação da expressão gênica

MicroRNAs (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

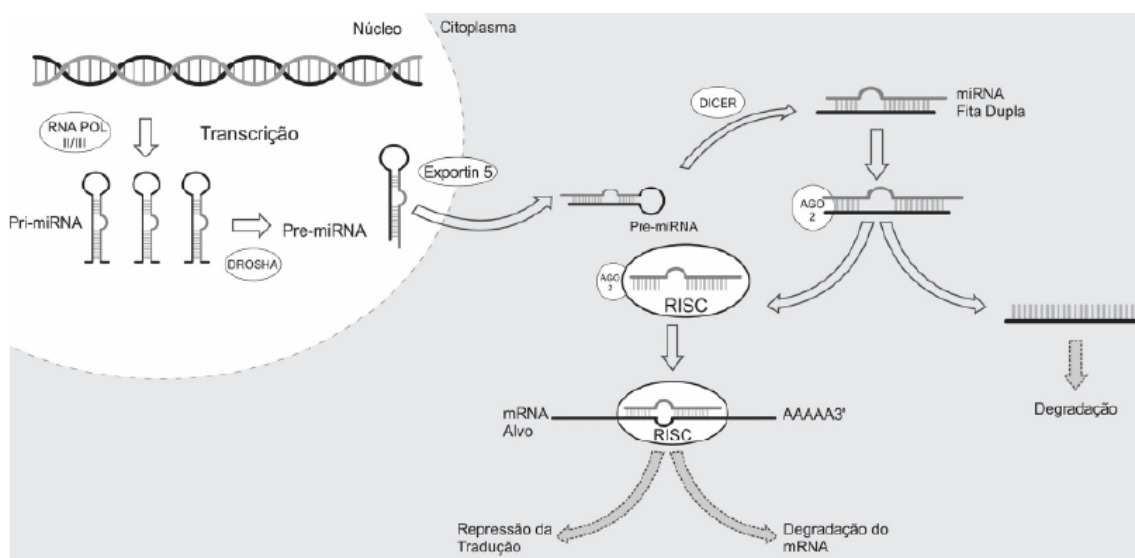
como pré-miRNA) originando o miRNA maduro³². Os miRNAs reprimem pós-transcricionalmente a expressão gênica pelo reconhecimento de locais complementares na região 3' não traduzida (3' UTR) de seus RNAs mensageiros alvos.

Atualmente, mais de 28645 miRNAs de 223 espécies estão registrados no banco de dados microRBase (miRBase v. 21.0); são conhecidos atualmente 2588 miRNAs humanos e 1915 miRNAs em camundongos (janeiro de 2016). 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 biogênese de um miRNA começa com a síntese de um longo transcrito primário conhecido como pri-microRNA. Os pri-microRNAs 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 3'³³⁻³⁵. 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 Alu³⁶.

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*)³⁷⁻⁴⁰. A DGCR8 forma com a Drosha um grande complexo conhecido como complexo microprocessador, que em humanos possui ~650 kDa³⁸⁻⁴⁰. Esse complexo

microprocessador reconhece e cliva o pri-microRNA, originando uma molécula com estrutura de *hairpin* de aproximadamente 70 pb, o pré-microRNA^{41,42}. Um subconjunto de miRNAs, conhecidos como miRtrons utiliza uma via alternativa, na qual os pré-microRNA são derivados como produto secundário de um evento de *splicing*, sem a necessidade de processamento pela Drosha⁴³⁻⁴⁵. Após o processamento nuclear, cada pré-microRNA é exportado para o citoplasma pela exportina-5 (EXP5), membro da família de receptores de transporte sendo convertido para miRNAs maduro e funcional pela Dicer nuclear⁴⁶⁻⁴⁸. 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)⁴⁹. 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. Da mesma maneira como ocorre a seleção de um siRNA^{50,51}, a fita que possui sua extremidade 5' formando o duplex mais instável com sua fita parceira parece preferencialmente sobreviver como o miRNA no RISC^{42,50,51}. 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^{52,53}. 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^{52,54}.



Campos et al.2011⁵⁵

Figura 3. Biogênese e principais mecanismos de ação dos miRNAs. A enzima RNA polimerase II realiza a transcrição dos microRNAs primários (pri-miRNA). O complexo enzimático *Drosha* cliva os grampões formando precursores do miRNA (pre-miRNA), os quais são carregados ao citoplasma e associados ao complexo *Exportin-5-Ran-GTP-dependent* (*Exportin 5*). No citoplasma, o pre-miRNA é clivado pelo complexo *Dicer*, perdendo a configuração em grampo. O miRNA fita-dupla formado associa-se à proteína Argonata 2 e uma das fitas é acoplada ao complexo de proteínas que reprime a expressão do gene alvo (RISC), enquanto a outra é degradada. O RISC, contendo o miRNA, liga-se ao mRNA-alvo, reprimindo a sua tradução ou promovendo a sua degradação.

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 miRNA⁵⁶. Os miRNAs trabalham de forma orquestrada para controlar uma via ou função biológica comum^{57,58}; essa característica única dos miRNAs os tornam ferramentas eficientes para determinação de vias específicas envolvidas em doenças ou processos biológicos.

1.5. MicroRNAs músculo-específicos e miogênese

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 miocardina⁵⁹⁻⁶². 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 musculares⁶³⁻⁶⁹. 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-7b. Van Rooij *et al.* 2008⁶¹ recentemente propuseram a existência de uma rede composta por esses três miRNAs, denominada de *MyomiR*, codificada pelos genes da miosina, que está envolvida na regulação da expressão de MyHC e, potencialmente dos tipos de fibras musculares. Além disso, alguns miRNAs não músculo-específicos também regulam a diferenciação muscular^{65,70} e regeneração após injúria^{65,71}.

A modulação da expressão gênica por miRNAs surgiu como um nível transcricional adicional para o controle da miogênese³⁰. A função dos miRNAs na regulação miogênica foi inicialmente descrita pela expressão dos miRNAs músculo-específico miR - 1, miR - 133a e miR - 206⁷²⁻⁷⁴. Estudos subsequentes demonstraram que a superexpressão do miR- 1, em células *HeLa*, diminuía a regulação direta ou indireta de mais de 100 mRNAs, além de alterar o perfil de expressão global dessas células⁵². Nos mioblastos da linhagem celular C2C12, os miRNAs miR-1, miR-133a, miR-206, miR-214 e miR-186 influenciam a diferenciação miogênica^{63,64,70,75,76}. Esses resultados mostram os miRNAs como importantes reguladores dos diferentes estágios da miogênese.

Através de algoritmos computacionais do *miRWalk database*⁷⁷, identificamos que o miR-155 é um importante candidato a regulador pós-transcricional da Ogn, sendo identificado por 6 diferentes algoritmos de predição. Várias doenças humanas vêm

sendo associadas com alterações no nível de expressão do miR-155, provavelmente causadas pelos alvos já validados dessa molécula, incluindo fatores de transcrição, quinases, fatores de sinalização e receptores de membrana^{78,79}. Estudos recentes têm mostrado que o miR-155 funciona como um miRNA oncogênico⁸⁰⁻⁸²; esse miRNA é caracterizado como um típico miRNA multifuncional por induzir alterações no ciclo celular⁸³ e aumentar a proliferação celular⁸⁴. Adicionalmente, o miR-155 desempenha um papel crucial em diversos processos fisiológicos tais como morte celular⁷⁸ e hipertrofia do músculo cardíaco⁸⁵⁻⁸⁷. Além disso, trabalho desenvolvido no laboratório de Kunkel *et al.* 2007⁸⁸ analisaram o perfil de expressão de miRNAs em dez grandes doenças musculares e, dos 185 miRNAs que se apresentaram desregulados, os autores destacam o miR-155 com expressão alterada em nove das doenças musculares estudadas.

Experimentos realizados por Seok *et al.* 2011⁸⁹ também demonstraram a relação da expressão do miR-155 nos processos da miogênese pela inibição da expressão do Mef2a, um importante co-fator regulador do processo de diferenciação dos mioblastos, membro da família *myocyte enhancer factor 2* (Mef2). A expressão aumentada do miR-155 reprimiu a expressão endógena do Mef2a e alterou o processo de diferenciação miogênica em células C2C12⁸⁹. Esses autores avaliaram o número e o tamanho dos mioblastos e miotubos, de forma quantitativa, demonstrando que o miR-155 diminui o tamanho e o número dos miotubos. Entretanto, os autores destacam que a repressão de Mef2a pelo miR-155 gerou apenas uma “modesta” desregulação na diferenciação dos mioblastos. Considerando os estudos atuais que comprovam que os miRNAs possuem uma propriedade cooperativa, na qual regulam mais de um transcrito para a determinação do fenótipo celular⁹⁰, podemos sugerir a possibilidade do miR-155 regular outros importantes transcritos alvos na miogênese.

Os dados de expressão diferencial da Ogn entre mioblastos e miotubos apresentados por Chan et al. 2011¹⁸ mostraram uma aparente correlação inversa com os dados de expressão do miR-155 apresentados por Chen et al. 2006⁶³ nessas células. Além disso, Meyer et al. 2015⁹¹ recentemente identificaram uma forte correlação inversa, ainda não validada, entre o miR-155 e a Ogn após realizarem análise integrativa entre miRNAs e mRNAs alvos desregulados com o tratamento de células musculares esqueléticas com TNF- α e IGF1. Sendo assim, esses dados indicam o RNA mensageiro da Ogn como um importante alvo ainda não validado para regulação pós-transcricional do microRNA miR-155 no controle da miogênese. Portanto, a hipótese desse trabalho é que a Ogn é regulada pós-transcricionalmente pelo mir-155 para controle dos processos da miogênese.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

1. Avaliar a possível regulação da osteoglicina pelo miR-155 durante a miogênese de células C2C12.

2.2. Objetivos Específicos

Utilizando como modelo de miogênese as células C2C12:

1. Validar a interação funcional do miR-155 com a Ogn;
2. Verificar o efeito da transfecção do miR-155 na proliferação, migração e diferenciação celular utilizando inibidores ou miméticos desse miRNA;
3. Avaliar o efeito da inibição da Ogn, por siRNA, na proliferação, migração e diferenciação celular.

3. Material e Métodos

3.1. Cultura Celular

Nesse estudo foi utilizada a linhagem celular de camundongo C2C12, constituída por mioblastos que podem ser diferenciados em miotubos⁹². Essa linhagem celular é uma importante ferramenta para o estudo da miogênese, pois expressa importantes vias celulares e moleculares do músculo esquelético e, além disso, possui uma grande quantidade de dados disponíveis, incluindo dados de *microarrays* e sequenciamento de RNA (*RNAseq*)^{91,93-97}. Células da linhagem C2C12 obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ) foram tripsinizadas e divididas em células para expansão e para os grupos de estudo. As células foram cultivadas em garrafas com meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Thermo Fisher, EUA*) complementados com 10% soro fetal bovino (SFB – *Thermo Fisher, EUA*) e 1% de antibiótico (*Penicillin-streptomycin solution stabilized – Thermo Fisher, EUA*) até atingirem uma confluência de 80% (dentro um período de ~ 2-3 dias). Posteriormente, as células foram tripsinizadas; uma parte foi transferida para outra garrafa para serem expandidas; a outra metade foi distribuída em placas de 6 poços, em uma concentração de 200.000 células por poço e iniciou-se os tratamentos.

3.1.1. Delineamento Experimental

Foram plaqueadas 200.000 mioblastos C2C12, em placas de 6 poços, mantidos em meio de cultura de crescimento DMEM + SFB 10% + 1% antibiótico. Após atingirem 60-70% de confluência, as células foram transfectadas por 15 horas em diferentes condições descritas nos tópicos subsequentes.

Para formar os grupos de estudo, foram transfectados diferentes oligonucleotídeos sintéticos, formando 6 grupos experimentais (três ou mais réplicas biológicas independentes/grupo experimental):

miR-155 mimic: mioblastos C2C12 transfectados com miR-155 mimético

Controle: mioblastos C2C12 transfectados com controle negativo

miR-155 inhibitor: mioblastos C2C12 transfectados com inibidor do miR-155

Controle: mioblastos C2C12 transfectados com controle negativo

siRNA-Ogn: mioblastos C2C12 transfectados com 2 oligos distintos de siRNA para a Ogn

Controle: mioblastos C2C12 transfectados com controle negativo

Após as transfecções, os mioblastos C2C12 do estudo foram coletados ou induzidos à diferenciação miogênica. Para essa diferenciação, assim que os mioblastos atingiram 80% de confluência, o meio de crescimento foi substituído com DMEM, sem SFB, contendo soro de cavalo (2%), L-glutamina e penicilina/estreptomicina (1%), com um período de indução à diferenciação de mioblastos em miotubos de 120 horas (5 dias), como descrito na **figura 4**.

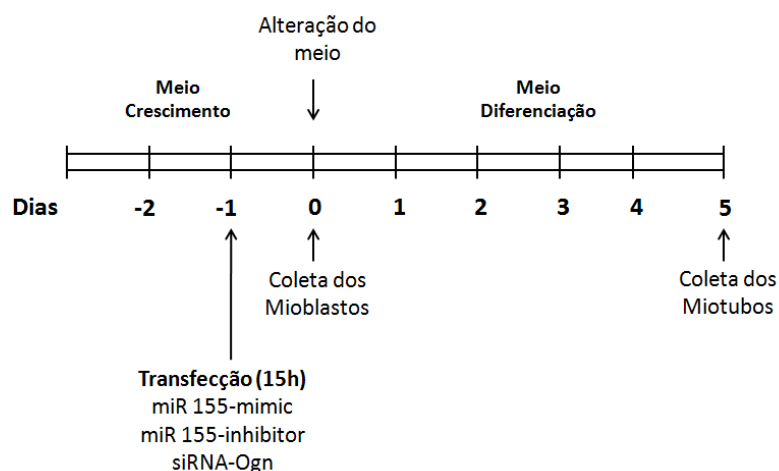


Figura 4. Delineamento experimental para as análises funcionais do miR-155 e Ogn durante a miogênese. Após atingirem 60-70% de confluência, as células foram transfectadas por 15 horas com os oligonucleotídeos de miR 155-*mimic*, miR 155-*inhibitor*, siRNA-Ogn e os seus respectivos controles negativos. Após a transfecção, foram coletados os mioblastos e/ou, posteriormente, foram coletados os miotubos diferenciados pela mudança do meio de crescimento (DMEM + soro fetal bovino + antibiótico) para meio de diferenciação (DMEM + soro de cavalo + antibiótico) durante 120 horas (5 dias).

3.2. Transfecção Celular

3.2.1. Miméticos do miR-155 (miR 155-*mimic*)

O *mimic miR-155* (Thermo Fisher, mirVana™ miRNA Mimic, código: 4464066; MC13058 - MC10203) e seu controle negativo (Thermo Fisher, mirVana™ miRNA Mimic Negative Control, código: 4464058) foram transfectados em mioblastos da linhagem C2C12. Para o processo de transfecção, foi realizada a formação de dois complexos para serem utilizados na solução final de transfecção. Primeiramente a *Lipofectamine RNAiMAX* (Thermo Fisher, EUA) foi diluída em Opti-MEM® *Reduced Serum Medium* (Thermo Fisher, EUA) para a formação do primeiro complexo. Em seguida, os oligonucleotídeos de *mimic miR-155* e controle negativo foram diluídos em Opti-MEM® para a formação do segundo complexo. O complexo Lipofectamina+Opti-

MEM foi misturado com o complexo oligos+Opti-MEM e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados 250µl da solução final de transfecção em cada poço contendo as células C2C12 (confluência 80%) e meio de crescimento normal e as células foram incubadas por um período de 15 horas.

3.2.2. Inibidores do miR-155 (miR 155-*inhibitor*)

Foram transfectados em mioblastos C2C12 o *inhibitor miR-155* (*Thermo Fisher*, mirVana™ miRNA *Inhibitor*, cód: 4464084; MH13058 - MH10203) e seu controle negativo (*Thermo Fisher*, mirVana™ miRNA *Inhibitor* Negative Control, cód: 4464076). O processo de transfecção das células com o inibidor do miR-155 e seu controle negativo, seguiu o mesmo protocolo descrito para a transfecção do miméticos do miR-155 (item 3.2.1).

3.2.3. Silenciamento gênico pós-transcricional da osteoglicina (Ogn)

O silenciamento gênico pós-transcricional da osteoglicina (Ogn) foi realizado por RNAs de interferência (siRNA). Os siRNAs para o mRNA da Ogn foram transfectados em células C2C12 (mioblastos ou miotubos) para estudarmos os efeitos do *knockdown* da Ogn em parâmetros fenotípicos e moleculares da miogênese. As sequências dos oligos de siRNA-Ogn foram obtidas em ferramentas disponíveis para seleção de RNAs de interferência a partir da informação dos transcritos alvos em <http://bioinfo.appliedbiosystems.com/genome-database/sirna.html> . Foram selecionadas duas sequências de Silencer® Select siRNA (s70945 e s70947, *Thermo Fisher*) (**Figura suplementar 1**). A empresa fabricante fornece a garantia de silenciamento do transcrito alvo quando utilizado duas moléculas de siRNA para o silenciamento do transcrito da Ogn. Foi realizada a formação de dois complexos para serem utilizados na solução final

de transfecção. Primeiramente a *Lipofectamine RNAiMAX* (Thermo Fisher, EUA) foi diluída em Opti-MEM® *Reduced Serum Medium* (Thermo Fisher, EUA) para a formação do primeiro complexo. Em seguida, as moléculas de siRNA para a Ogn ou para seu respectivo controle negativo (Silencer® Select Negative Control No. 1 siRNA, Thermo Fisher, USA) foram diluídos em Opti-MEM® para a formação do segundo complexo. O complexo Lipofectamina+Opti-MEM foi misturado com o complexo oligo+Opti-MEM e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados 250µl da solução final de transfecção em cada poço contendo as células C2C12 e meio de crescimento normal e as células foram incubadas por um período de 15 horas.

3.3. RT-qPCR

A RT-PCR foi realizada para analisar a expressão gênica da Myog, Myod, Myh2 (marcador moleculares de proliferação e diferenciação miogênica) e da Ogn durante a proliferação e diferenciação das células C2C12. Os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do MIQE: *Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment*⁹⁸.

3.3.1. Extração do RNA

A extração do RNA total foi realizada com TRIzol Reagent (Thermo Fisher, USA) segundo as instruções do fabricante. O RNA extraído foi eluído em água ultrapura livre de nucleases. Em seguida, o RNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento *NanoVue Plus* (GE HealthCare, Reino Unido).

3.3.2. Integridade do RNA

Após avaliação da concentração de RNA total (ng/μl), a pureza foi assegurada pelas razões 260/280 nm (razão de ~2,0). Primeiramente, a integridade das amostras de RNA foi realizada pela observação das bandas dos RNAs ribossomais 28S e 18S, determinado por electroforese em gel de agarose a 1% corados com GelRed™. Em seguida, a integridade do RNA foi confirmada através do 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)^{99,100}. Após isso, o RNA foi tratado e incubado com TURBO DNase (Ambion, EUA) para remover a contaminação com DNA genômico.

3.3.3. Reação de Transcrição Reversa (síntese de cDNA)

A transcrição reversa do RNA foi realizada utilizando o kit *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Thermo Fisher, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Para cada reação foram utilizados 10ul *Master Mix* para a transcrição reversa ao qual foi adicionado o 2ug de RNA e completado com água livre de nucleases até atingir o volume final de 20ul. 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.

3.3.4. PCR Quantitativo em Tempo Real

A qPCR foi realizada utilizando-se o kit *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega, EUA) utilizando-se 2 μL do produto da RT, 10 μL de *GoTaq® qPCR Master Mix*, 2μL de *primers sense* e *anti-sense* (nas concentrações ótimas previamente testadas), e água ultra pura livre de RNase suficiente para um volume final de 20 μL de solução. Os *primers* para os genes analisados (**Tabela 1**) foram desenhados através dos softwares

Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) a partir de sequências publicadas no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/), e sintetizados pela empresa *Integrate DNA Technologies* (*Integrated DNA Technologies, Inc.*, EUA). As reações para cada transcrito foram realizadas em duplicatas, no Sistema *Quanstudio™ 12K Flex Real-Time PCR System* (*Thermo Fisher*, EUA). As condições de termociclagem da reação de qPCR foram padronizadas de acordo com as instruções do fabricante do equipamento. A quantificação relativa foi realizada através do método do Cq (ciclo de quantificação) comparativo e os valores obtidos foram normalizados pelos valores de expressão obtidos para o gene de referência *Rpl13a*. Análises prévias do nosso laboratório já tinham identificado esse gene de referência como altamente estável nesse modelo experimental: miogênese *in vitro* de células da linhagem C2C12.

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

<i>Gene</i>	Nome Oficial	NCBI REF Seq	Sequência dos Iniciadores
<i>Myh2</i>	<i>Mus musculus myosin, heavy polypeptide 2</i>	NM_001039545.2	CGAAGAGTAAGGCTGTCCCG GCGCATGACCAAAGGTTTCA
<i>Ogn</i>	<i>Mus musculus osteoglycin</i>	NM_008760.4	AATGATGAAATGCCCACATGCC TTTGGCAATGGTGGTACAGC
<i>Myod1</i>	<i>Mus musculus myogenic differentiation 1</i>	NM_010866.2	TCCTCATAGCACAGGGGTGA GCAAGCTGTGGGGAAAAGTG
<i>Myog</i>	<i>Mus musculus myogenin</i>	NM_031189.2	CAGCCCAGCGAGGGAATTTA AGAAGCTCCTGAGTTTGCCC
<i>Rpl13a</i>	<i>Mus musculus ribosomal protein L13A</i>	NM_009438.5	AACGGACTCCTGGTGTGAAC TGGTCCCCACTTCCCTAGTT

NCBI REF Seq: sequência de referência NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3.4. Ensaio de Migração – *Wound Healing*

O ensaio *Wound Healing* foi realizado para a análise qualitativa *in vitro* da migração celular. Para a elaboração desse ensaio, os mioblastos C2C12 transfectados por 15 horas (miR 155 - *mimic*, miR 155 - *inhibitor* ou siRNA-Ogn), foram investigados quanto ao seu potencial de migração. Os mioblastos foram cultivados em placas de 6 poços na concentração de 4×10^4 células/cm², até a confluência de 80% em que foi realizada a transfecção. Após a transfecção, as células foram mantidas em meio de crescimento normal (DMEM + 10% soro fetal bovino + 1% antibiótico) até atingirem a confluência de 100%. As monocamadas foram lesadas (riscadas) em linha reta no centro de cada poço com o uso de uma ponteira estéril de 200uL, utilizando como apoio a tampa estéril da placa de 6 poços para a obtenção de um risco regular. A área lesada na placa foi inspecionada nos tempos 0, 12, 24 e 48 horas em microscópio invertido de contraste de fase e as imagens foram capturadas nesses intervalos com a utilização de câmera digital acoplada *AxioCam ICc5* (*Carl Zeiss Microscopy*, Alemanha). A área de fechamento da lesão foi calculada comparando a percentagem da área da ferida no primeiro momento até o fechamento total da risco, nos diferentes pontos de tempo, utilizando o programa ImageJ® (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

3.5. Ensaio de Proliferação

A proliferação dos mioblastos foi analisada pelo ensaio MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue*; *Sigma-Aldrich*, EUA). O ensaio foi realizado pela medição da proliferação celular através do MTT solúvel (solução amarelada) que pode ser convertido em MTT insolúvel de cor azul escuro por desidrogenases mitocondriais de células vivas em divisão celular. Os cristais azuis são solubilizados com DMSO (*Dimethyl sulfoxide*) e a intensidade corresponde a medida colorimétrica de

comprimento de onda a 595 nm. Os mioblastos tratados foram cultivados em placas de 96 poços na concentração de 5×10^3 células por poço. As células foram mantidas em meio de crescimento normal por 24 horas. Após a aderência, foi realizado o ensaio de proliferação nos tempos de 0 (primeiro dia do ensaio), 12, 24, 36 e 48 horas. O meio das células foi removido, lavado com PBS (*Phosphate-buffered saline*, Thermo Fisher, EUA) e foi acrescentado 100 µL de MTT, solubilizado em água ultrapura (10mg/ml), em cada poço. As células foram mantidas por 4 horas a 37°C para que houvesse a incorporação do MTT pelas mitocôndrias e então a conversão em MTT formazan pelas desidrogenases mitocondriais das células vivas, resultando em cristais azuis. Em seguida, a solução de MTT foi removida e adicionamos 200 µL de DMSO (*Dimethyl sulfoxide*, Sigma-Aldrich, EUA) para a lise das células e exposição dos cristais. A intensidade da solução foi medida por método colorimétrico do comprimento de onda a 595 nm no aparelho *Biochrom Asys Expert Plus* (Biochrom Ltd., Reino Unido). A taxa de proliferação celular foi calculada através da variação entre a absorbância nos tempos analisados e absorbância inicial em relação à variação do tempo normalizado. Esses dados foram quantificados e convertidos em taxa de proliferação por hora em relação ao controle.

3.6. Western Blot

3.6.1. Extração proteica

Os mioblastos e miotubos de todos os grupos experimentais, presentes em placas de 6 poços, foram lavados 2 vezes com PBS (*Phosphate-buffered saline*, Thermo Fisher, EUA) e, em cada poço, foram adicionados 250 µL de tampão de lise RIPA (*Radio-Immunoprecipitation Assay*; Sigma-Aldrich, EUA). Após incubação por 24 horas a -20°C, os poços foram raspados para completa lise celular, o homogeneizado

resultante foi transferido para tubos de 1,5 mL e centrifugado a 8000 g, por 10 minutos a 4°C. A concentração proteica total do sobrenadante foi analisada pelo método de *Bradford*¹⁰¹ *Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, EUA), utilizando as curvas de *BSA Protein Standard* (Bio-Rad Laboratories, EUA) como padrão.

3.6.2. Eletroforese e *Immunoblotting*

As amostras das proteínas extraídas foram diluídas em tampão *Laemmli* (*Sample Buffer Laemmli 2x Concentrate*, Sigma-Aldrich, EUA) e separadas por eletroforese utilizando sistema *Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell* (Bio-Rad, EUA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico de empilhamento (Tris-HCL 240mM pH 6,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed) e de resolução (Tris-HCL 240mM pH 8,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed), na concentração de 10%. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio-Rad, EUA) para identificação do tamanho das bandas. A corrida eletroforética foi efetuada a 120V (*Power Pac HC 3.0A*, Bio-Rad, EUA, por aproximadamente 2 horas, com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema *Mini-Trans Blot* (Bio-Rad, EUA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). As membranas foram lavadas duas vezes com tampão TBS-T (Tris-HCl 20mM, NaCl 137mM e detergente Tween 20 0,1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário às membranas foram bloqueados mediante incubação com solução a 0,5% de leite em pó desnatado, dissolvido em tampão TBS-T, por 120 minutos, à temperatura ambiente, sob constante agitação. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora, sob agitação *overnight*. Após a incubação com o anticorpo primário

(**Tabela 2**), as membranas foram lavadas três vezes em TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário em solução bloqueadora por 2 horas sob agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, as membranas foram lavadas três vezes em TBS-T. Por fim, a imuno-deteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência, de acordo com as instruções do fabricante (*Enhancer Chemi-Luminescence*, Amersham Biosciences, EUA) para visualização das bandas. As membranas de nitrocelulose foram expostas ao Fotodocumentador ImageQuant TM LAS 4000 (*GE Healthcare*, EUA) para obtenção das bandas de proteínas.

Tabela 2. Anticorpos primários utilizados para o ensaio de *Western Blot*.

Anticorpos Primários	Código	Concentração Utilizada	Peso Molecular
Osteoglycin (Santa Cruz Biotechnology, EUA)	SC-374463	1:1000	34 kDa
MyoD (Santa Cruz Biotechnology, EUA)	SC-760	1:1000	45 kDa
Myogenin (Santa Cruz Biotechnology, EUA)	SC-576	1:1000	34 kDa
Myh2 (Santa Cruz Biotechnology, EUA)	SC-20641	1:500	200 kDa
Gapdh* (Cell Signaling Technology, EUA)	14C10	1:5000	37 kDa
α -tubulin* (Santa Cruz Biotechnology, EUA)	SC-5286	1:2000	55 kDa

*Anticorpos para detecção das proteínas de referência utilizadas para normalização dos dados. Para as diferentes condições testadas, definimos a atualização do Gapdh como normalizador nos tratamentos com *mimics* e *inhibitors* e a α -tubulin como normalizador no tratamento com siRNAs.

Os anticorpos primários e secundários foram testados em diferentes diluições, assim como a solução bloqueadora e as demais etapas metodológicas. A quantificação dos blots foi feita por densitometria utilizando o *software* Image J versão 1.49j (<http://imagej.nih.gov/ij>). Os valores obtidos foram normalizados pelos valores obtidos para as proteínas Gapdh e α -tubulin.

3.7. Ensaio de Luciferase

3.7.1. Busca on-line por alvos preditos do miR-155

A busca por alvos preditos computacionalmente de miR-155 foi realizada *on-line* utilizando os programas: TargetScan¹⁰² (www.targetscan.org) (Figura 5A).

3.7.2. Construção dos vetores pmiRGlo-Ogn 3'UTR-wt e -Mut

O sítio predito de ligação do miR-155 na região 3'UTR da Ogn foi obtido utilizando o programa *TargetScan*. Um par de oligonucleotídeos contendo a região 3'UTR da Ogn correspondente ao sítio predito de miR-155 foi sintetizado:

Ogn-3'UTR-Fw-wt

5'- TCGAGTAGCGGCCGCTAGTACTGTGAAACTAAACAGCATTAAAT-3',

Ogn-3'UTR-Rev-wt

5'- CTAGATTAATGCTGTTTAGTTTCACAGTACTAGCGGCCGCTAC-3'

Esses dois oligonucleotídeos possuem sequências complementares entre si, de forma que, ao serem anelados, compõem um segmento de DNA de fita dupla correspondente ao sítio de ligação de miR-155 à região 3'UTR da Ogn, formando com extremidade coesivas aos sítios de restrição correspondentes às enzimas *XhoI* e *XbaI* (Figura 5B). Da mesma forma, outro par de oligonucleotídeos foi sintetizado:

Ogn-3'UTR-Fw-Mut

5'- TCGAGTAGCGGCCGCTAGTACTGTGAAACTAAACAcgtaAT-3',

Ogn-3'UTR-Rev-Mut

5'- CTAGATTgcattaGTTTAGTTTCACAGTACTAGCGGCCGCTAC-3'

Esse par de oligonucleotídeos contém mutações *misense*, inviabilizando a ligação do miR-155 a seu sítio predito (Figura 5B). Para a confirmação de clonagem

desses fragmentos no vetor, foi inserido sítio de restrição para a enzima *NotI* nos dois conjuntos de oligonucleotídeos. Os oligonucleotídeos foram diluídos na concentração de 1 μ g/ μ L e anelados em tampão de anelamento incluído no kit *pmiRGLO Dual-Luciferase Mirna Target Expression Vector* (Promega, EUA), seguindo das seguintes condições: aquecimento a 90°C por 3 min, seguido de incubação em banho-maria a 37°C por 15 min. Os segmentos resultantes do anelamento foram novamente diluídos à concentração final de 4ng/ μ L. Assim, após dupla digestão do plasmídeo pmiRGLO (Promega, EUA) com as enzimas *XhoI* e *XbaI*, foi realizada ligação de 4ng de oligonucleotídeos anelados a 50ng de vetor pmiRGLO linearizado, em presença de DNA Ligase (Biolabs, Reino Unido), 1X Tampão de Ligase, em volume final 20 μ L. O produto resultante da ligação foi purificado novamente e 2 μ L foram transformados por eletroporação em bactérias *E. coli* XL1-Blue, gentilmente doadas pela Profa. Dra Edna Kimura (ICB-USP), sendo estas plaqueadas em L.B. (*lysogeny broth*) ágar-ágar contendo ampicilina (100 mg/mL). DNA plasmidial de 10 clones originados da transformação foram extraídos utilizando o kit Wizard®Plus SV Minipreps (Promega, EUA) de acordo com instruções do fabricante. A validação do alvo Ogn foi realizada através da co-transfecção transiente dos plasmídeos pmiRGLO-Ogn-wt ou pmiRGLO-Ogn-Mut na presença ou ausência de miR-155 *mimic* (30nM) nas células C2C12 e também em fibroblastos NIH3T3, importante tipo celular que apresenta resistência à transfecção. Os fibroblastos NIH3T3 foram gentilmente doados pelo Prof. Dr. William Fernando Zambuzzi (IBB – UNESP).

A

```
DNA Ogn 3' UTR 5' ...ACTGTGAAACTAAACAGCATTA...
Posição 194-201 Ogn 3' UTR 5' ...ACUGUGAAACUAAACAGCAUUA...
                                     |||||
mmu-miR-155      UGGGGAUAGUGUUAUCGUAAUU
```

B

Ogn 3'UTR WT

```
1) Ogn-3'UTR-Fw-wt   TCGAGTAGCGGCCGCTAGTACTGTGAAACTAAACAGCATTAAT
2) Ogn-3'UTR-Rev-wt  CTAGATTAATGCTGTTTAGTTTCACAGTACTAGCGGCCGCTAC
```

```
5' TCGAG TA GCGGCCGC TAGT ACTGTGAAACTAAACAGCATTA T 3'
    | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
3'   C AT CGCCGGCG ATCA TGACACTTTGATTGTGCTAATT AGATC 5'
    XhoI      NotI      sítio de ligação de miR-155      XbaI
```

Ogn 3'UTR Mut

```
1) Ogn-3'UTR-Fw-mut   TCGAGTAGCGGCCGCTAGTACTGTGAAACTAAACAcgtaataT
2) Ogn-3'UTR-Rev-mut  CTAGATTgcattagTTTAGTTTCACAGTACTAGCGGCCGCTAC
```

```
5' TCGAG TA GCGGCCGC TAGT ACTGTGAAACTAAACAcgtaata T 3'
    | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
3'   C AT CGCCGGCG ATCA TGACACTTTGATTGTgcattat AGATC 5'
    XhoI      NotI      sítio de ligação de miR-155      XbaI
```

Figura 5. Construção dos plasmídeos pmiRGlo-Ogn-3'UTR-wt e -Mut para ensaio de gene reporter. (A) Sítio predito de ligação do miR-155 na região 3'UTR de Ogn, segundo o algoritmo TargetScan (www.targetscan.org). (B) Par de oligonucleotídeos (Ogn-3'UTR-Fw-wt e Ogn-3'UTR-Rev-wt) sintetizados para compor um segmento de DNA contendo o sítio predito de ligação de miR-155 na 3'UTR de Ogn. Um segundo par de oligonucleotídeos (Ogn-3'UTR-Fw-Mut e Ogn-3'UTR-Rev-Mut) contendo mutações na região “seed” do sítio de ligação de miR-155 foi utilizado como controle. Os oligonucleotídeos foram desenhados de forma que, ao serem anelados, contenham, além do sítio de ligação de miR-155, os sítios de restrição para as enzimas XbaI e XhoI, nas extremidades, e NotI na região central do inserto.

3.7.3. Ensaio de gene repórter Luciferase

Para a validação da regulação pós-transcricional da Ogn por miR-155, a linhagem de mioblastos C2C12 e de fibroblastos NIH3T3 foram semeadas em placas de 12 poços na densidade de 5×10^4 células por poço. Após 24h do plaqueamento, as células foram transfectadas com 1µg do vetor repórter (pmiRGlo-Ogn-3'UTR-wt ou -Mut) na presença ou ausência de 30nM de *mimic* miR-155. Um esquema representativo da estratégia utilizada para a validação da regulação pós-transcricional de Ogn por miR-155 utilizando o ensaio de gene repórter luciferase está mostrado na **figura 6**. Após 48 horas da transfecção, as células foram lavadas com PBS 1X e lisadas com 1X *Passive Lysis Buffer* (Promega, EUA). O lisado foi coletado e a atividade da luciferase (luminescência) realizada com o kit *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega, EUA). A leitura do sinal de luminescência foi realizada em placa opaca de 96 poços, em luminômetro *SpectraMax L* (Molecular Devices, EUA). Os valores foram normalizados pelo nível de luminescência da luciferase de *Renilla*, codificada no plasmídeo pmiRGlo através de um promotor independente.

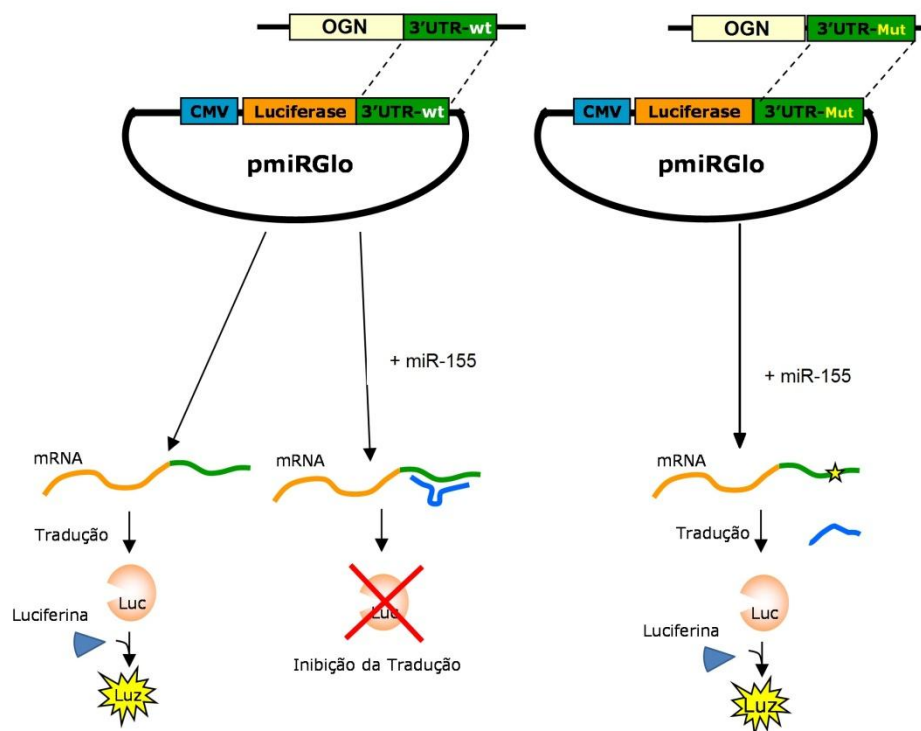


Figura 6. Ensaio de Gene Reporter Luciferase para a validação funcional de alvos de miRNAs. O segmento contendo o potencial sítio de ligação de miR-155 na 3'UTR de Ogn é clonado em plasmídeo pmiRGlo, em fusão ao gene da luciferase, gerando o plasmídeo pmiRGlo-OGN-3'UTR-wt. A transfecção de pmiRGlo-OGN-3'UTR-wt é realizada concomitantemente com miR155-mimic. A ligação do miR 155 diretamente à 3'UTR de Ogn induz repressão pós-transcricional do mRNA da luciferase, que resulta em diminuição dos níveis de luminescência. Como controle, a co- transfecção de um plasmídeo pmiRGlo-OGN contendo mutações no sítio de ligação de miR-155 impede a ligação de miR-155 na 3'UTR de Ogn, restaurando os níveis de luminescência (adaptado de Murilo Vieira Geraldo¹⁰³).

3.8. Imunofluorescência

Para avaliarmos a formação de miotubos, foi realizado imunofluorescência para a marcação da Myh2. Os mioblastos foram cultivados em placas de 6 poços contendo uma lamínula de 18mm (*Knittel Glass*, Alemanha). Após a aderência, as células foram tratadas com oligonucleotídeos miméticos de miR-155 e induzidas à diferenciação como descrito no **item 3.1.1**. Os miotubos foram lavados 2 vezes com tampão PBS, fixados com 4% de paraformaldeído por 15 minutos em temperatura ambiente, lavados 3 vezes

com PBS por 5 minutos, permeabilizados com 0,1% Triton X-100 (*Sigma*, EUA) por 10 minutos a 4°C e lavados 4 vezes com PBS por 5 minutos. Após isso, os miotubos foram bloqueados por 1 hora, em temperatura ambiente, com uma solução bloqueadora composta por 3% BSA (*Bovine Serum Albumin*), 1% glicina, 8% soro fetal bovino e 30uL de Triton X-100, diluídos em PBS. Em seguida, os miotubos foram incubados com 1 mL de anticorpos primários diluídos na solução bloqueadora, sob agitação leve à 4°C *overnight*. O anticorpo para Myh2 (*Santa Cruz Biotech.*, EUA) e para Ogn (*Santa Cruz Biotech.*, EUA) foram diluídos 1:600 em solução bloqueadora. Após a incubação com os anticorpos primários, os miotubos foram lavados 4 vezes com PBS e incubados com anticorpos secundários por 1 hora, sob agitação lenta à 4°C. Os secundários utilizados foram anti-rabbit FITC (*Sigma*, EUA) e anti-mouse TRITC (*Santa Cruz*, EUA) diluídos 1:600 em solução bloqueadora. Para remover o excesso de anticorpo secundário, os miotubos foram lavados 5 vezes com PBS e então a lamínula foi transferida para uma lâmina contendo 5uL de DAPI. Por fim, as imagens da imunofluorescência dos miotubos foram capturas com o microscópio confocal de varredura *TCS SP5* (*Leica Microsystems*, Reino Unido). A formação de miotubos foi avaliada através do índice de fusão dos mioblastos. Os núcleos totais, os núcleos dos miotubos e a área dos miotubos foram mensurados utilizando o *software ImageJ*. A Myh2 dos miotubos foi quantificada pelo aparelho *TCS SP5* (*software Leica Microsystems*, Reino Unido). O índice de fusão foi mensurado pela soma dos núcleos dos miotubos normalizada pela soma dos núcleos totais multiplicado por 100. Esse método permite analisar a diferenciação dos mioblastos de maneira consistente^{89,104,105}.

3.9. Análise estatística dos dados

GraphPad Prism® foi a ferramenta utilizada para análises estatísticas dos dados obtidos. Os valores de expressão gênica e proteica foram submetidos ao teste “*t*” de Student para amostras independentes. Os ensaios de migração e proliferação foram examinados por meio de análise de variância (ANOVA) para modelo de medidas repetidas em grupos independentes e complementados com teste de Bonferroni. Todos os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5% ($\alpha = 0,05$)

4. Resultados

4.1. Extração e análise da qualidade do RNA

O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol (*Thermo Fisher*, EUA), segundo as recomendações do fabricante. O RNA extraído foi eluído em água ultrapura livre de nucleases. A análise espectrofotométrica das amostras de RNA apresentou razão 260/280 nm > 1,9. A integridade das amostras de RNA foi realizada, primeiramente, pela observação das razões dos RNAs ribossomais 28S e 18S, determinado por eletroforese em gel de agarose a 1% corados com GelRed™ (**Figura suplementar 2**). Em seguida, a qualidade do RNA, determinada pelo número da integridade do RNA (*RNA Integrity Number*, RIN), foi de $9,51 \pm 0,28$ (média $\pm$ DP) (**Figuras suplementares 3 e 4**).

4.2. Regulação Pós-transcricional da Ogn pelo miR-155

Inicialmente observamos os níveis de miR-155 e Ogn (mRNA e proteína) possuem uma expressão inversa durante a miogênese em células C2C12 (mioblastos e miotubos de 24h e 120h) (**Figura 7**). Utilizando a ferramenta TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), o transcrito da Ogn (NM_014057) foi predito contendo um sítio de pareamento com o miR-155 em sua região 3'UTR, sugerindo a Ogn como um possível alvo regulado pelo miR-155 (**Figura 8A**). A região de interação entre miRNA-mRNA é conservada em diferentes espécies como humanos, chimpanzés, ratos, cachorros, gatos e cavalos (**Figura 8B**). Além disso, a sequência do miR-155 é altamente conservada entre as espécies (**Figura suplementar 5**). Para testar a hipótese de que o miR-155 pode regular a expressão da Ogn através da ligação em sua região 3'UTR, um sítio de ligação selvagem e um mutado da região 3'UTR foi clonado em um plasmídeo *luciferase reporter*, gerando os plasmídeos pmiRGlo-Ogn-wt e pmiRGlo-Ogn-Mut, respectivamente. Para testar a interação do miR-155 e Ogn em outro tipo celular, o ensaio de luciferase também foi realizado em fibroblastos NIH3T3. A co-transfecção de pmiRGlo-Ogn-wt com miR 155-*mimic* acarretou uma diminuição na atividade da luciferase tanto nas mioblastos C2C12 quanto nos fibroblastos NIH3T3. Além disso, o ensaio mostrou que o miR-155 não foi capaz de se ligar ao plasmídeo contendo a região de ligação mutada nos dois tipos celulares (**Figura 8C**). Para comprovar a regulação da Ogn pelo miR-155, o oligonucleotídeo sintético *miR-155-mimic* foi transfectado em mioblastos C2C12 e a expressão da Ogn foi avaliada por RT-qPCR e Western Blot. A transfecção do miR-155 diminuiu os níveis de expressão do mRNA da Ogn tanto em mioblastos como em miotubos. Além disso, o tratamento com miR-155 também diminuiu a expressão proteica da Ogn nos miotubos, entretanto, não foi observada alteração na expressão proteica da Ogn nos mioblastos (**Figura 9A e 9B**). Esses resultados demonstram que a transfecção do miR-155 regula pós-transcricionalmente a expressão da Ogn em mioblastos e miotubos.

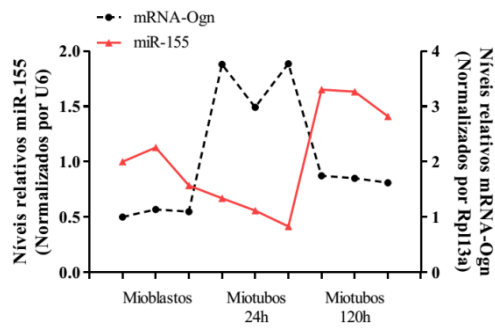
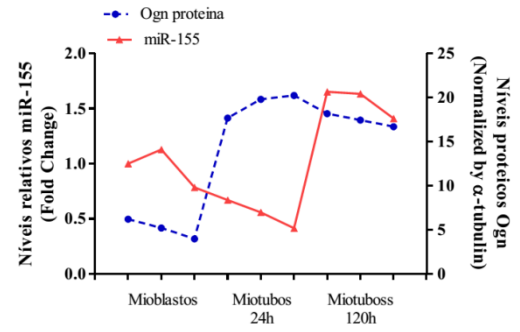
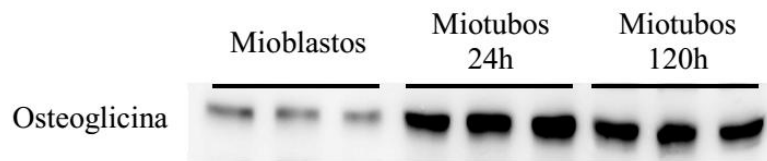
A**B****C**

Figura 7. Expressão da Ogn e do miR-155 durante a diferenciação de células C2C12. Expressão do miR-155 e Ogn nas células musculares durante a miogênese foi determinada por RT-qPCR e Western Blot. Foram avaliados mioblastos, miotubos diferenciados por 24h e 120h. **A)** Níveis de expressão do miR-155 e da Ogn (mRNA). O miR-155 foi normalizado pelo miRNA de referência U6 e a Ogn (mRNA) foi normalizada pelo gene de referência Rpl13a. **B)** Níveis de expressão do miR-155 e da Ogn (proteína). A proteína da Ogn foi normalizada pela expressão da α -tubulina utilizando Western Blot. **C)** Blots representativos da proteína Ogn durante a miogênese.

A

Posição 194-201 Ogn 3' UTR 5' ...ACUGUGAAACUAAACAGCAUUA...
mmu-miR-155 3'-UGGGGAUAGUGUUAUUCGUAAUU-5'

B

mmu-miR-155 3' -UGGGGAUAGUGUUAUUCGUAAUU- 5'
Mus musculus (Mouse) ... ---CUAAACAGCAUUAAGGGU---...
Homo sapiens (Human) ...AUAUUUAAACAGCAUUAACAAAUC...
Pan troglodytes (Chimpanzee) ...AUAUUUAAACAGCAUUAACAAAUC...
Rattus norvegicus (Rat) ...AUA---ACAGCAUUAAGAAAC---...
Canis familiaris (Dog) ...AUAUUUAAACAGCAUUAUAAAAUC...
Felis catus (Cat) ...AUAUUUAAAGCAGCAUUAACAAAUC...
Equus caballus (Horse) ...AUAUUUAAAUAGCAUUAACAAAUC...

C

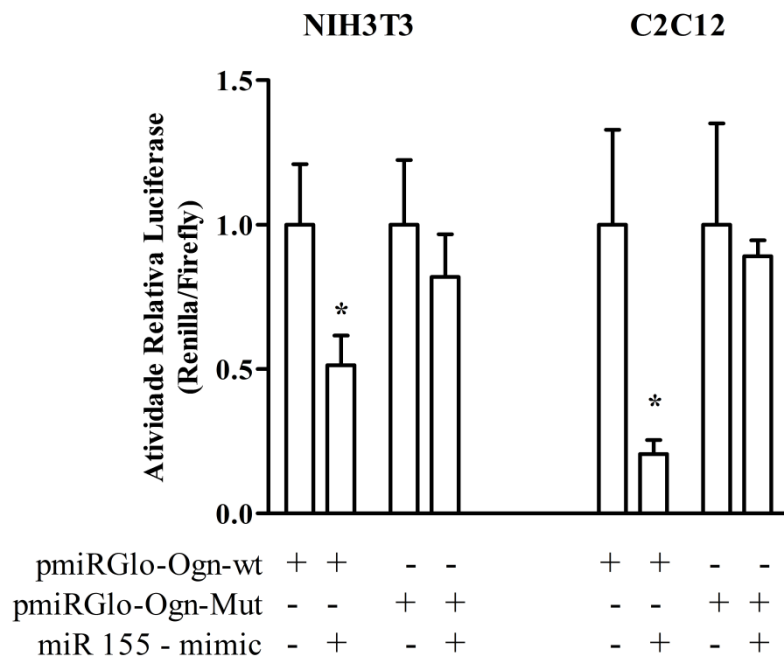
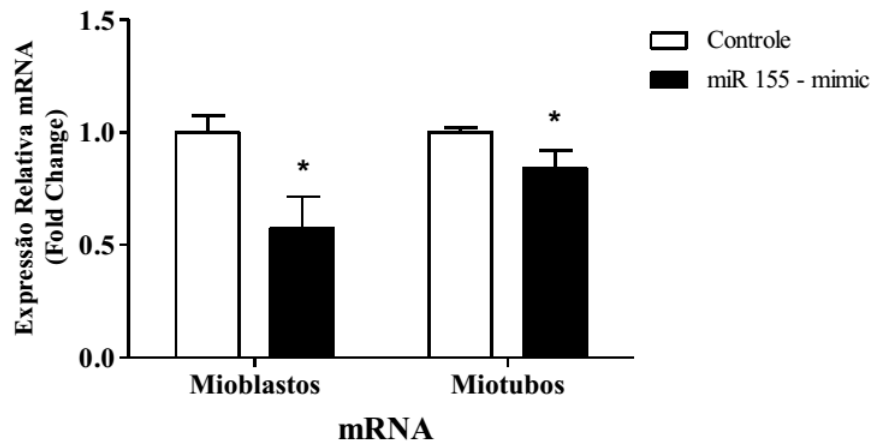


Figura 8. Identificação do sítio funcional de pareamento entre a Ogn e o miR-155. (A) Representação esquemática do segmento da região 3'UTR de Ogn com sítio predito para interação com miR-155. **(B)** As sequências “seed matched” da região 3'UTR da Ogn, altamente conservada entre diferentes espécies, estão destacadas em vermelho. **(C)** Ensaio de gene repórter para ligação do miR-155, realizado após transfecção de plasmídeos contendo sítio selvagem (pmiRGlo-Ogn-wt) ou mutado (pmiRGlo-Ogn-Mut) de ligação predita entre o miR-155 na região 3'UTR da Ogn na presença (+) ou ausência (-) de miR 155-mimic. Os valores da luciferase *firefly* foram normalizados pela luminescência da luciferase de *Renilla* uma vez que pmiRGlo contém o gene codificador da luciferase de *Renilla* independente. *p<0,05 vs. pmiRGlo-Ogn-wt.

A



B

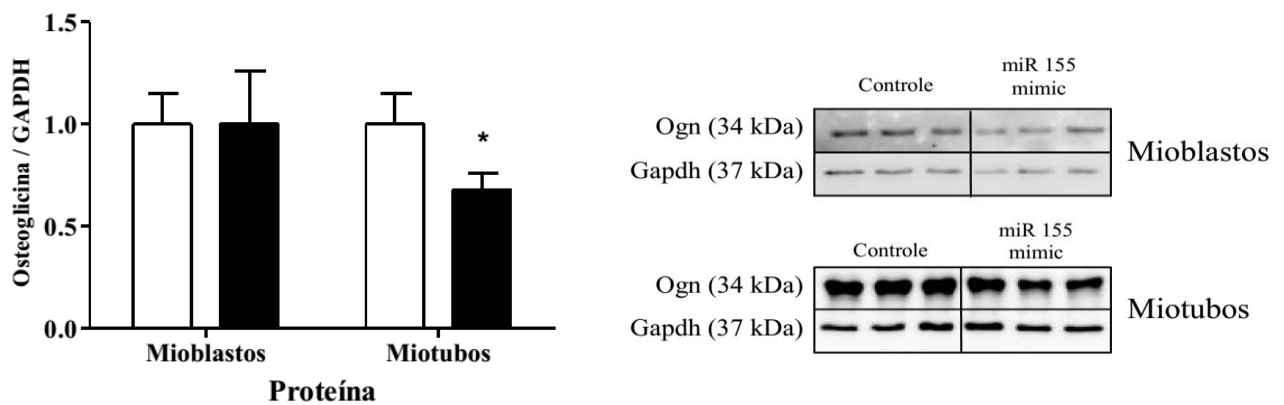


Figura 9. Regulação pós-transcricional da Ogn pelo miR-155 na miogênese. (A) Expressão gênica da Ogn nos mioblastos e miotubos C2C12, determinada por RT-qPCR, normalizada pelo gene de referência Rpl13a. **(B)** Expressão proteica da Ogn nos mioblastos e miotubos C2C12, utilizando ensaio de Western Blot, normalizada pela proteína Gapdh. Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. Diferença estatística foi analisada pelo teste “t” de Student. * $p < 0,05$ vs. Controle. Ogn: *osteoglycin*; mRNA: RNA mensageiro; Gapdh: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*; kDa: kilodalton.

4.3. miR-155 e Ogn desregulam marcadores moleculares da miogênese

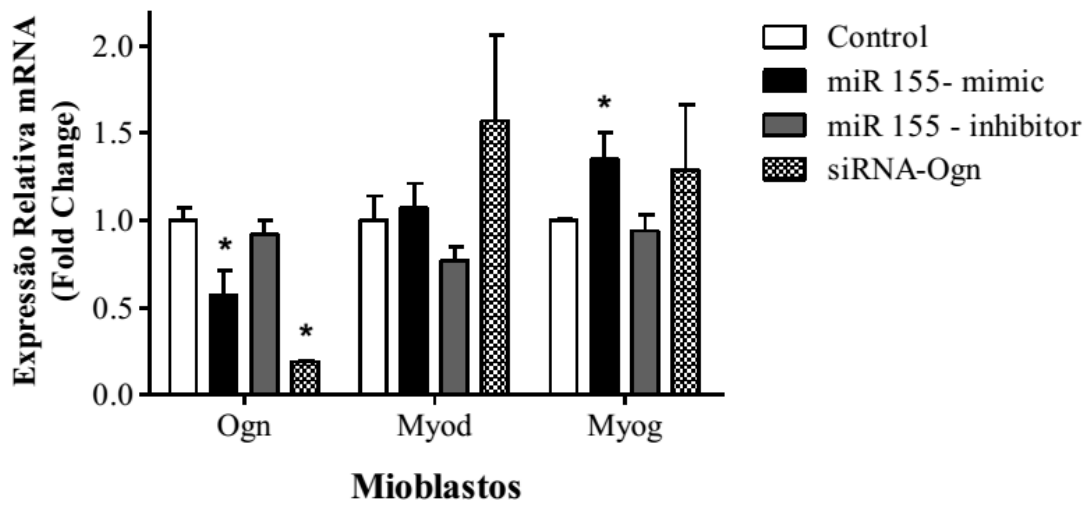
4.3.1. Análise de expressão gênica

Para estudar a função do miR-155 e da Ogn na miogênese esquelética, foram transfectados oligonucleotídeos (*miR 155-mimic*, *miR 155-inhibitor*, siRNA-Ogn e seus respectivos controles negativos) nas células C2C12. Após a transfecção, os mioblastos indiferenciados ou miotubos diferenciados foram coletados e foi realizada análise de expressão gênica dos marcadores miogênicos Myod, Myog e Myh2.

Os resultados do RT-qPCR mostraram um aumento significativo da Myog nos mioblastos transfectados com miR-155, sugerindo que a transfecção desse miRNA desregula a proliferação dos mioblastos. A expressão da Ogn diminuiu mais de 80% nos mioblastos após a transfecção com siRNA-Ogn, mostrando que o *knockdown* foi efetivo, entretanto não alterou a expressão dos marcadores moleculares da miogênese nos mioblastos. A inibição do miR-155 também não acarretou alterações nas expressões dos marcadores miogênicos (**Figura 10A**).

Nos miotubos diferenciados, a superexpressão do miR-155 provocou uma diminuição na expressão gênica da Myh2, um importante marcador de diferenciação de células musculares, sugerindo assim que o miR-155 pode desregular a diferenciação dos mioblastos em miotubos. Entretanto, a inibição desse miRNA não alterou a expressão dos marcadores moleculares da miogênese. Nossos resultados mostraram que o *knockdown* da Ogn diminuiu a expressão gênica da Myod, Myog e Myh2, sugerindo que a inibição desse transcrito inibe a expressão gênica dos marcadores da miogênese relacionados ao processo de diferenciação dos mioblastos em miotubos (**Figura 10B**).

A



B

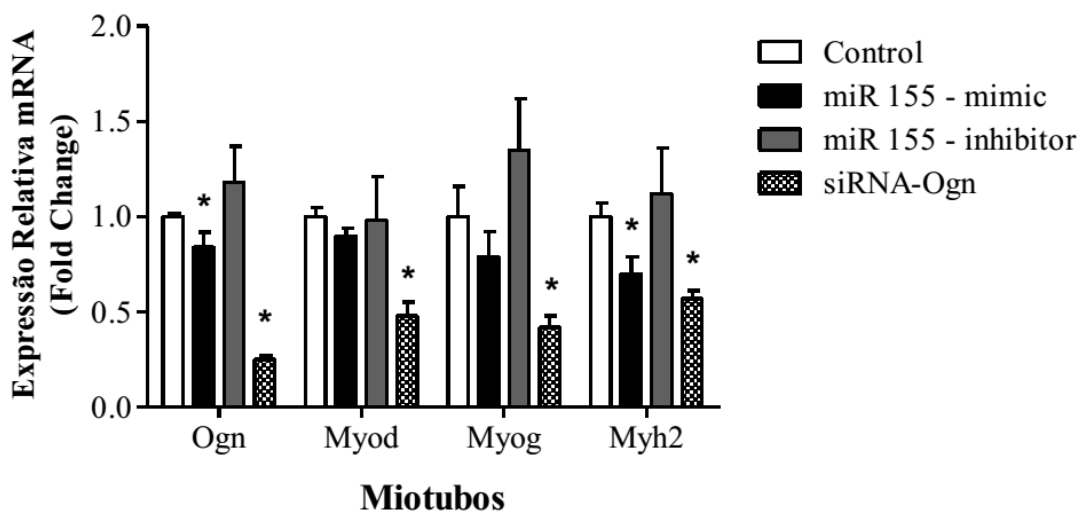


Figura 10. Ogn e miR-155 desregulam os fatores transcricionais da miogênese e o marcador molecular da diferenciação. (A) Expressão gênica da Ogn, dos marcadores moleculares da miogênese Myod e Myog, nos mioblastos C2C12 tratados com miR-155 *mimic*, miR 155 *inhibitor* e siRNA-Ogn, determinada por RT-qPCR, normalizada pelo gene de referência RPL13a. **(B)** Expressão gênica da Ogn, dos marcadores moleculares da miogênese Myod, Myog e Myh2 nos miotubos C2C12 tratados com miR-155 *mimic*, miR 155 *inhibitor* e siRNA-Ogn, determinada por RT-qPCR, normalizada pelo gene de referência Rpl13a (*ribosomal protein L13A*). Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. Diferença estatística foi analisada pelo teste “t” de Student. *p<0,05 vs. Controle. Ogn: *osteoglycin*; Myod: *myogenic differentiation 1*; Myog: *miogenin*; Myh2: *myosin heavy chain II*.

4.3.2. Análise dos níveis proteicos

Para estudar a função do miR-155 e da Ogn na miogênese esquelética, foram transfectados oligonucleotídeos (*miR 155-mimic*, *miR 155-inhibitor*, siRNA-Ogn e seus respectivos controles negativos) nas células C2C12. Após a transfecção, mioblastos indiferenciados ou miotubos diferenciados foram coletados e foi realizada análise de expressão proteica dos marcadores miogênicos Myod, Myog e Myh2.

Os resultados do Western Blot mostraram uma diminuição significativa da Myh2 nos miotubos transfectados com miR-155 (**Figura 11B**). A Myh2 é um importante marcador de diferenciação miogênica, sendo apenas expressa a partir da diferenciação dos miotubos^{76,89}. Esse resultado sugere que a transfecção do miR-155 desencadeia uma diminuição na diferenciação dos mioblastos em miotubos. Entretanto, a transfecção com miR-155 não alterou os níveis proteicos dos marcadores moleculares da miogênese Myod e Myog, nos mioblastos e nos miotubos (**Figura 11A**). A transfecção com o oligonucleotídeo inibidor do miR-155 não provocou nenhuma alteração nos níveis proteicos dos marcadores e da Ogn, avaliados tanto nos mioblastos quanto nos miotubos (**Figura 12A e 12B**).

Após a transfecção com siRNA-Ogn observamos que a expressão da Ogn diminuiu 80% nos mioblastos e 73% nos miotubos, mostrando que o *knockdown* foi efetivo a atingiu os níveis proteicos. Porém, observamos que o *knockdown* da Ogn não alterou a expressão proteica dos marcadores moleculares da miogênese (**Figura 13A e 13B**).

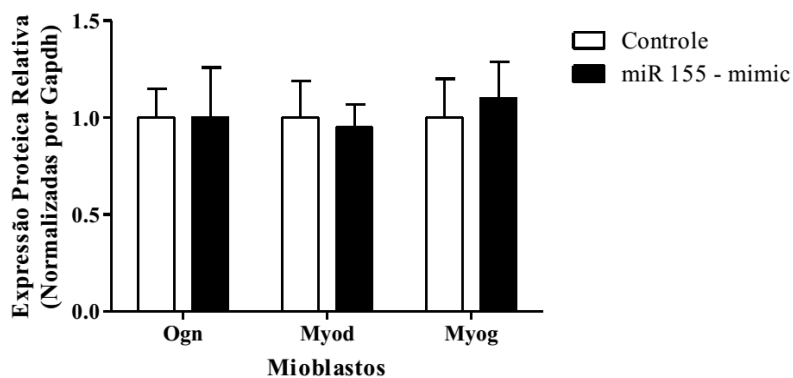
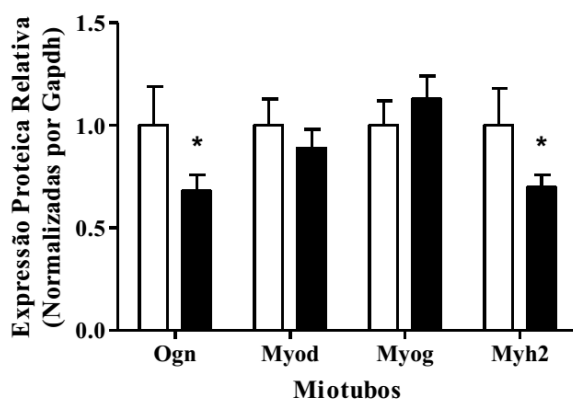
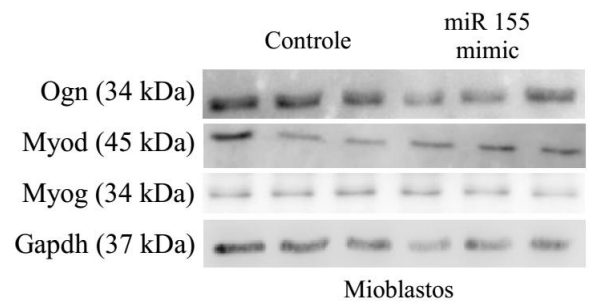
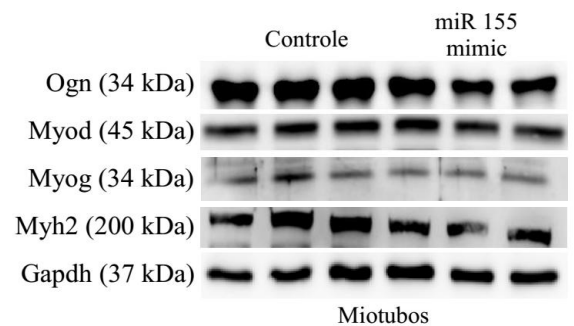
A**B****C****D**

Figura 11. miR-155 altera os níveis de expressão proteica da Myh2 e Ogn na miogênese. **A)** Níveis de expressão proteica da Ogn e dos marcadores moleculares da miogênese Myod e Myog nos mioblastos C2C12 tratados com miR-155 *mimic*, determinada por Western Blot, normalizada pela proteína de referência Gapdh. **(B)** Níveis de expressão proteica da Ogn e dos marcadores moleculares da miogênese Myod, Myog e Myh2 nos miotubos C2C12 tratados com miR-155 *mimic*, determinada por Western Blot, normalizada pela proteína de referência Gapdh. **C e D)** Blots representativos. Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. Diferença estatística foi analisada pelo teste “*t*” de Student. * $p < 0,05$ vs. Controle. Ogn: *osteoglycin*; Myod: *myogenic differentiation 1*; Myog: *myogenin*; Myh2: *myosin heavy chain II*; Gapdh: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*.

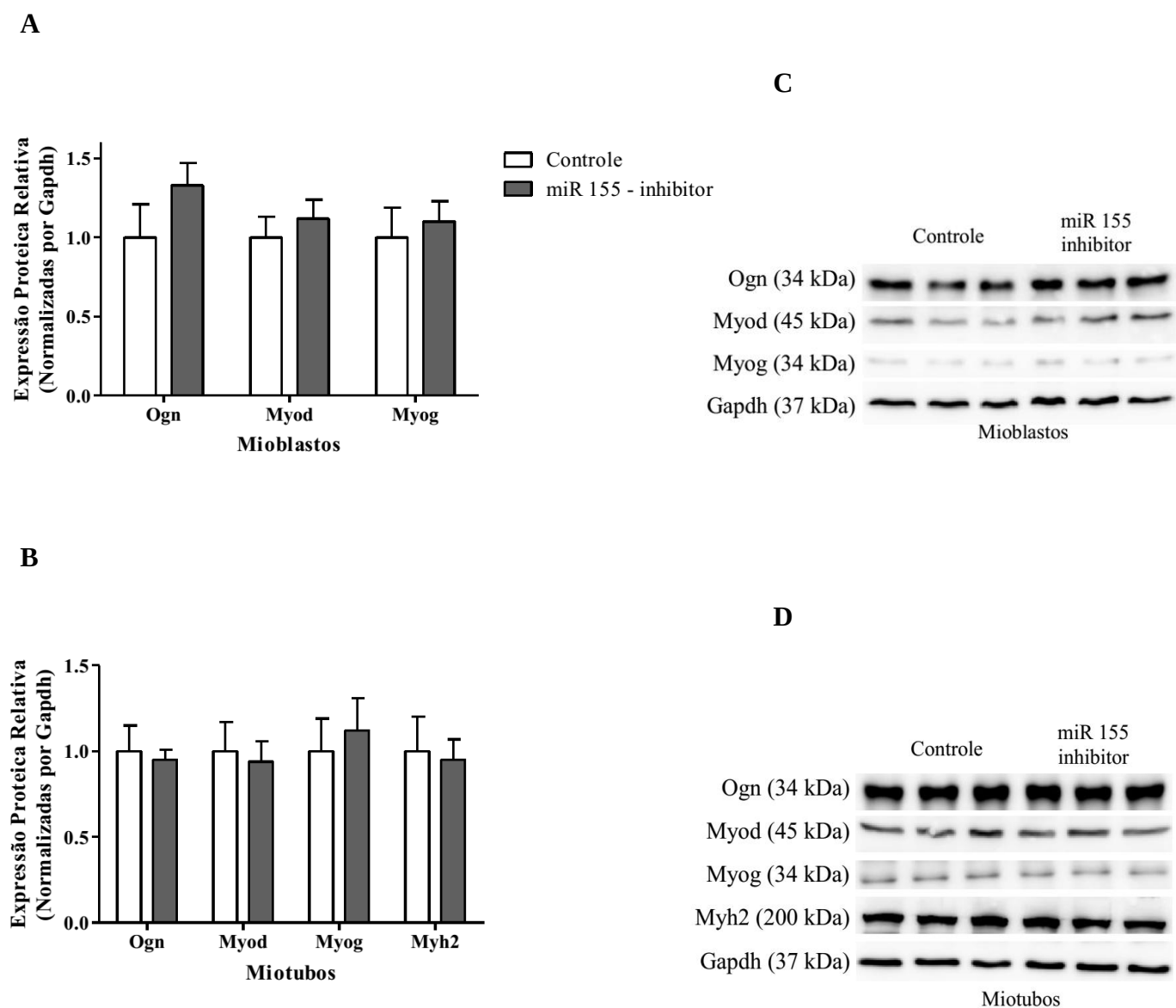
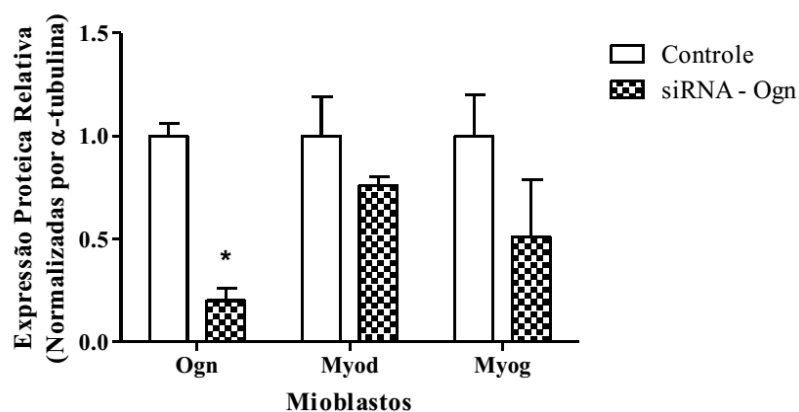
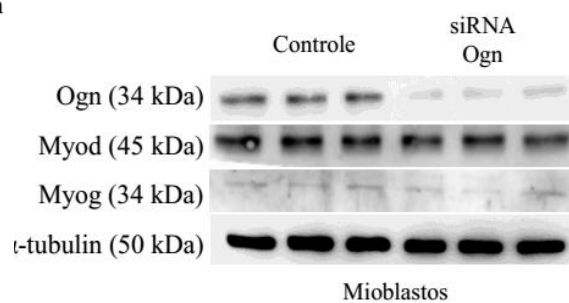


Figura 12. Inibição do miR-155 não altera os níveis de expressão proteica de Ogn, Myod, Myog e Myh2 na miogênese. **A)** Expressão proteica da Ogn, dos marcadores moleculares da miogênese Myod e Myog nos mioblastos C2C12 tratados com miR-155 *inhibitor*, determinada por Western Blot, normalizada pela proteína de referência Gapdh. **(B)** Expressão proteica da Ogn, dos marcadores moleculares da miogênese Myod, Myog e Myh2 nos miotubos C2C12 tratados com miR-155 *inhibitor*, determinada por Western Blot, normalizada pela proteína de referência Gapdh. **C) e D)** Blots representativos. Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. Diferença estatística foi analisada pelo teste “t” de Student. * $p < 0,05$ vs. Controle. Ogn: *osteoglycin*; Myod: *myogenic differentiation 1*; Myog: *myogenin*; Myh2: *myosin heavy chain II*; Gapdh: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*.

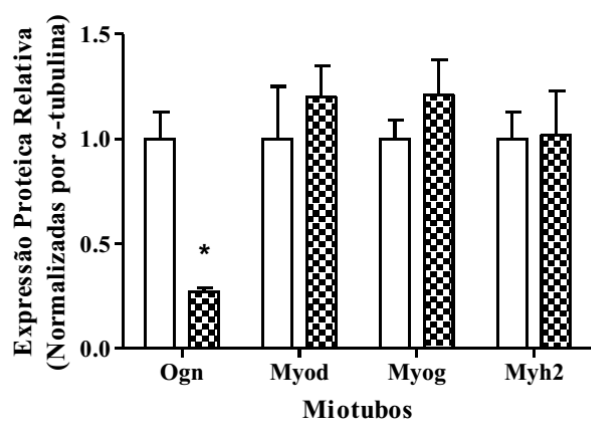
A



C



B



D

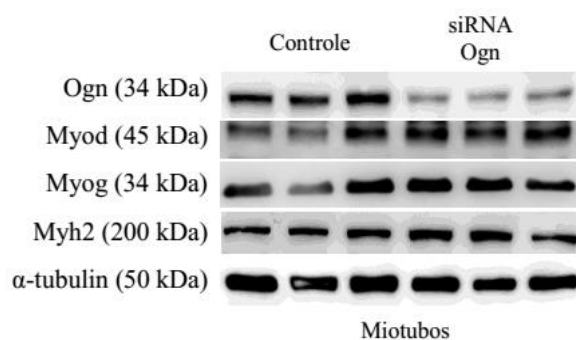
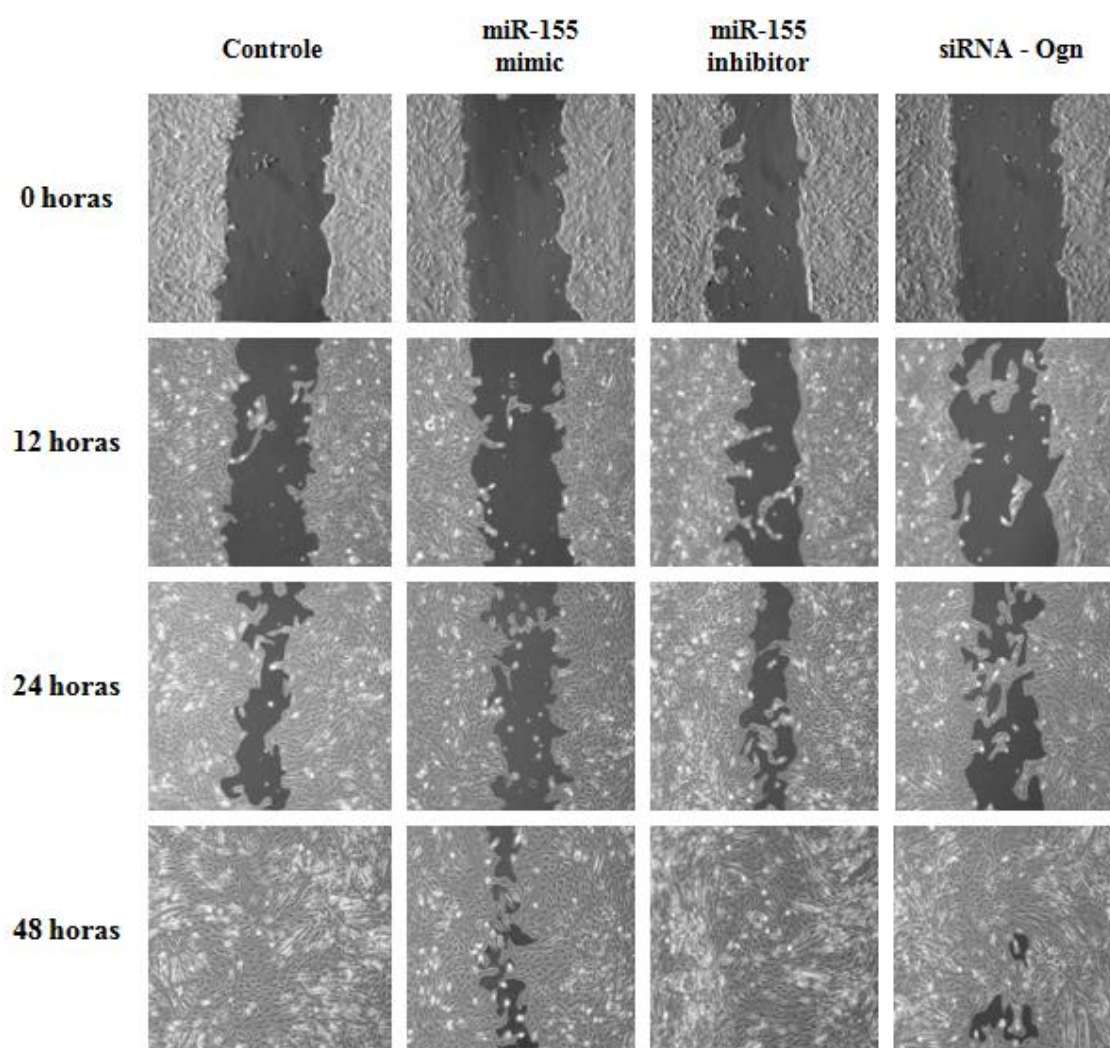


Figura 13. Efeito do *knockdown* da Ogn nos níveis de expressão proteica de Myod, Myog e Myh2 na miogênese. **(A)** Expressão proteica da Ogn, dos marcadores moleculares da miogênese Myod e Myog nos mioblastos C2C12 tratados com siRNA-Ogn, determinada por Western Blot, normalizada pela proteína de referência α -tubulina. **(B)** Expressão proteica da Ogn, dos marcadores moleculares da miogênese Myod, Myog e Myh2 nos miotubos C2C12 tratados com siRNA-Ogn, determinada por Western Blot, normalizada pela proteína de referência α -tubulina. **(C) e (D)** Blots representativos. Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. Diferença estatística foi analisada pelo teste “*t*” de Student. * $p < 0,05$ vs. Controle. Ogn: *osteoglycin*; Myod: *myogenic differentiation 1*; Myog: *myogenin*; Myh2: *myosin heavy chain II*.

4.4. miR-155 diminui a migração dos mioblastos C2C12

Para estudar os efeitos do miR-155 e da Ogn na migração das células C2C12, os oligonucleotídeos de miR155-*mimic*, miR155-*inhibitor* e siRNA-Ogn foram transfectados nos mioblastos C2C12. A migração dos mioblastos foi avaliada pelo ensaio *Wound Healing*, como descrito em Grzelkowska-Kowalczyk *et al.* 2015¹⁰⁴. As células transfectadas com o miR-155 diminuíram a migração celular após 24 e 48 horas. O ensaio revelou que, após 24 h e 48 h, as células transfectadas com o miR-155 cobriram menos de 50% e 88% do corte, respectivamente. Entretanto, não houve diferença significativa na migração das células C2C12 após a inibição do miR-155 e da Ogn (**Figura 14**). Portanto, o ensaio de *Wound Healing* revelou que o aumento da expressão do miR-155 diminui a migração das células C2C12.

A



B

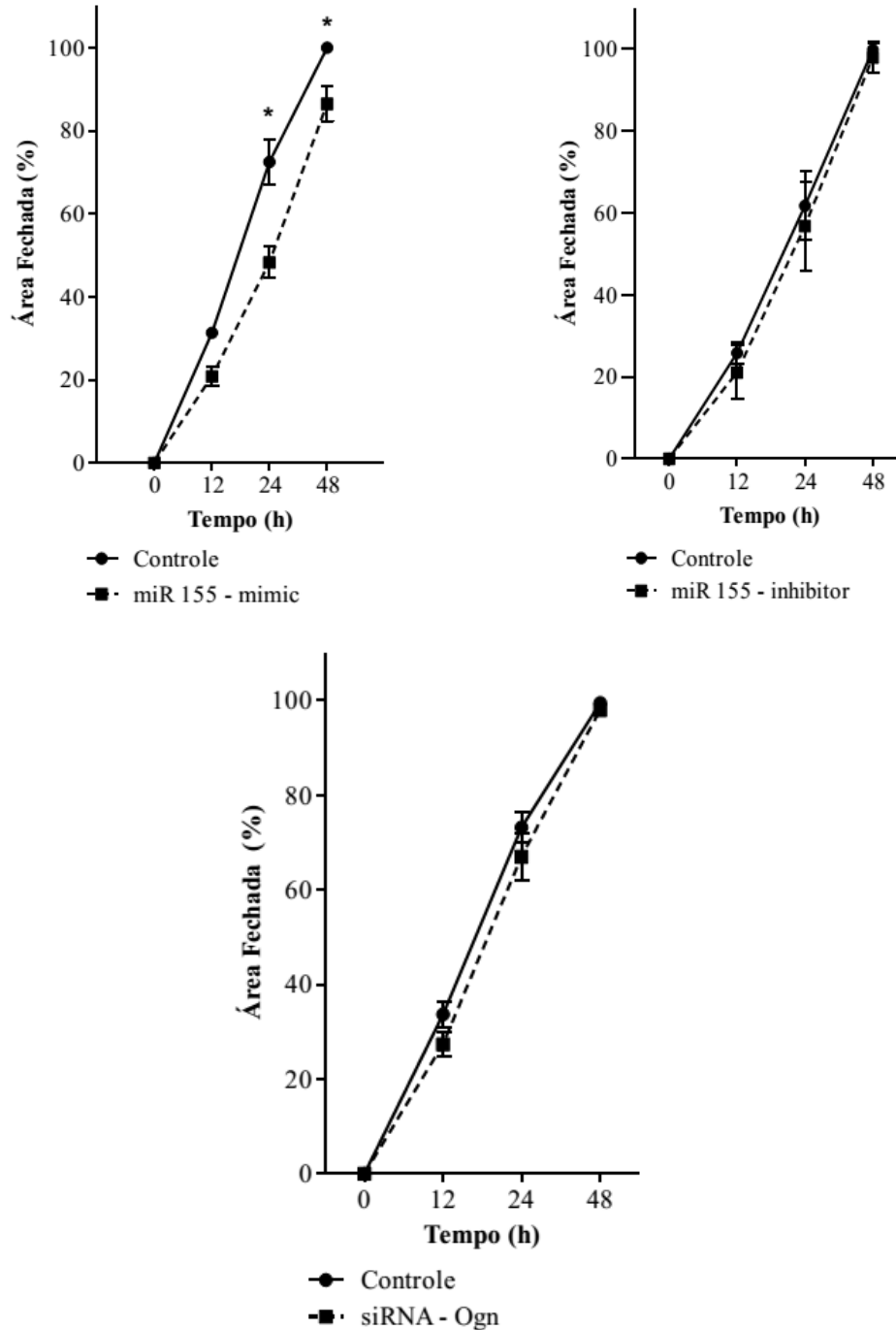


Figura 14. miR-155 diminui a migração dos mioblastos C2C12 (A) Fotos representativas dos mioblastos transfectados com miR155-mimic, miR155-inhibitor, siRNA-Ogn e Controle, dos tempos 0h, 12h, 24h e 48h pós corte **(B)** Análise da migração celular das células C2C12 mensurada pelo método de *Wound-Healing*. O fechamento do corte foi quantificado nos tempos 0h, 12h, 24h e 48h *post-wound* pela medição das áreas não cicatrizadas, utilizando o software *ImageJ*. Dados expressos em porcentagem relativa (%) $\pm$ desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas e grupos independentes. * $p < 0,05$ vs. Controle.

4.5. miR-155 e Ogn diminuem a proliferação das células C2C12

Para estudar os efeitos do miR-155 e da Ogn na proliferação das células C2C12, os oligonucleotídeos de miR155-*mimic*, miR155-*inhibitor* e siRNA-Ogn foram transfectados para os mioblastos C2C12. A proliferação foi mensurada pelo ensaio de MTT como descrito em Mosmann 1983¹⁰⁶. As células transfectadas com o miR-155 apresentaram uma menor proliferação dos mioblastos, nos períodos de 36 e 48 horas, comparadas com os mioblastos controles. De maneira semelhante, o *knockdown* da Ogn induziu uma diminuição estatisticamente significativa na taxa de proliferação dos mioblastos nos períodos de 12 e 24 horas (**Figura 15**). Entretanto, a taxa de proliferação não sofreu alterações após a inibição do miR-155. Esses resultados demonstram que a proliferação das células C2C12 pode ser reduzida pela transfecção do miR-155 e pelo *knockdown* da Ogn, sugerindo que a Ogn e o miR-155 alterem a proliferação das células C2C12. Além dessa avaliação da proliferação dos mioblastos, será realizado o ensaio de BrDU para a confirmação desses dados e os resultados serão apresentados publicação final desse trabalho.

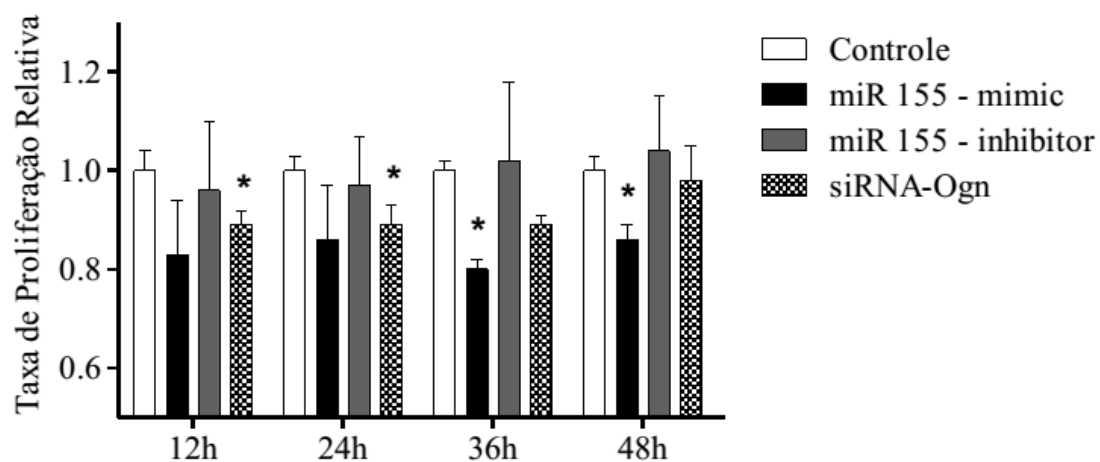


Figura 15. miR-155 e Ogn diminuem a taxa de proliferação de mioblastos C2C12. Proliferação das células C2C12 analisada pelo ensaio de MTT após a transfecção com miR 155-*mimic*, miR 155-*inhibitor*, siRNA-Ogn. A taxa de proliferação celular foi calculada através da variação entre a absorbância nos tempos 12, 24, 36, 48 horas e absorbância inicial em relação à variação do tempo normalizado. Estes dados foram quantificados e convertidos em taxa de proliferação por hora em relação ao controle. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas e grupos independentes. * $p < 0,05$ vs. Controle.

4.6. miR-155 inibe a diferenciação de células C2C12

Para investigar a etapa final da miogênese, foi avaliado o efeito da transfecção do miR-155 na diferenciação dos mioblastos em miotubos. Células C2C12 foram transfectadas com oligonucleotídeos miméticos de miR-155 e, em seguida, foram induzidas à diferenciação para a formação de miotubos multinucleados. Foi realizada uma imunofluorescência utilizando os anticorpos para Ogn e para a Myh2, um importante marcador de diferenciação miogênica. As células transfectadas com miR-155 apresentaram uma menor capacidade de formar miotubos quando comparadas com o respectivo controle. Essa alteração no processo de formação de miotubos foi comprovada pela diminuição do índice de fusão dos mioblastos e da quantidade de núcleos de miotubos. Além disso, a área dos miotubos nas células transfectadas com miR-155 foi menor em relação ao controle. Em conjunto, esses dados demonstram que o miR-155 desregula a miogênese e altera o fenótipo dessas células C2C12 (**Tabela 3 e Figura 16**).

Tabela 3. Alterações morfológicas nos miotubos

	Controle	miR 155 - <i>mimic</i>	p valor
Núcleos Totais	257,3 ± 31,1	259,4 ± 27,5	p=0,829
Células Mononucleadas	164,2 ± 17,1	217,3 ± 21,6	p<0,0001
Núcleos de miotubos multi (>3) nucleadas	93,2 ± 21,7	42,1 ± 13,6	p<0,0001
Área do miotubo (µm)	3178,3 ± 698,6	1890,3 ± 530,9	p<0,0001
Índice de Fusão	35,9 ± 5,5	16,6 ± 4,6	p<0,0001
Pixel total de Myh2	7865,7 ± 1836,4	4957,8 ± 1014,1	p<0,0001

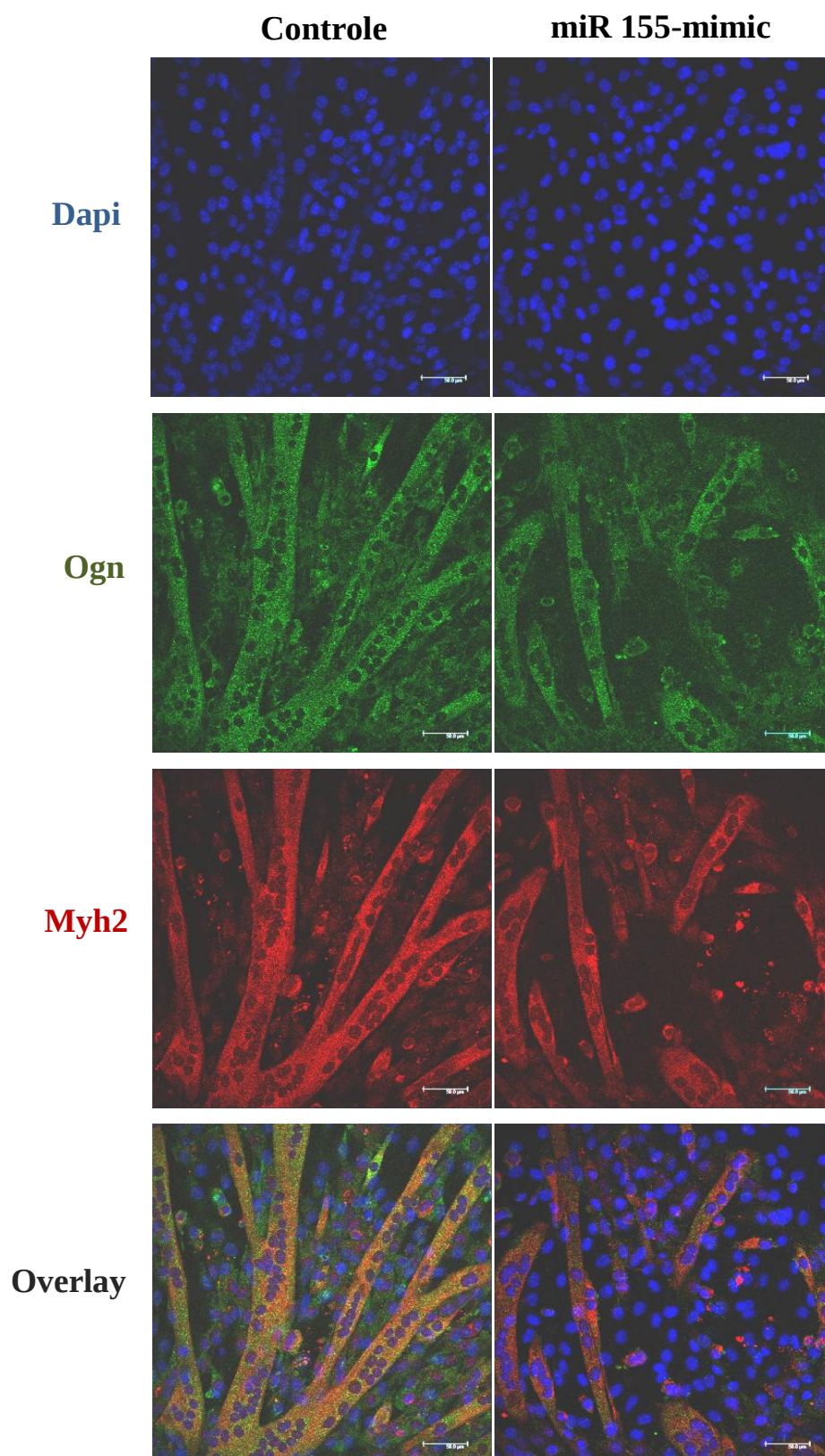


Figura 16. miR-155 altera formação de miotubos na miogênese. Imunofluorescência das células C2C12 tratadas com miR 155-*mimic* e controle. Células foram induzidas a diferenciação e marcadas com os anticorpos para Myh2 (vermelho) e Ogn (verde). Dapi foi utilizado para marcação dos núcleos.

5. Discussão

No presente estudo, foi avaliada a possível regulação da expressão da osteoglicina (Ogn) pelo microRNA miR-155 nos processos de proliferação, migração e diferenciação da miogênese em células musculares esqueléticas da linhagem C2C12. Ensaio de luciferase realizados em células C2C12 e fibroblastos NIH3T3 validaram que a região 3'UTR da Ogn é um alvo direto do miR-155; em células C2C12, o miR-155 reprimiu os níveis de expressão gênica e proteica da Ogn. Também foi observado que a repressão da Ogn mediada pelo miR-155 apresenta uma importante função na regulação da expressão gênica de células musculares esqueléticas, com alteração na expressão dos fatores transcricionais Myog e Myod, e da proteína Myh2. Portanto, esses dados demonstram uma nova via de regulação para o miR-155 e a Ogn durante a miogênese esquelética.

miR-155 regula pós transcricionalmente a Ogn em células C2C12

Inicialmente, foi avaliada a expressão da Ogn e do miR-155 em condições normais, sem tratamento, das células C2C12 durante a miogênese. Verificamos que, durante esse processo, a Ogn apresentou um padrão de expressão gênico e proteico inverso em relação ao padrão de expressão do miR-155 (Figura 7A e 7B). O aumento do miR concomitante ao decréscimo da Ogn sugerem que o miR-155 reprime a expressão da Ogn durante a miogênese. Essas análises de expressão de miRNA e de seu respectivo mRNA alvo são geralmente utilizadas em experimentos que têm como objetivo avaliar a possível regulação de um determinado mRNA por um miRNA. Essa estratégia inicial de análise foi realizada anteriormente em células C2C12 durante a miogênese para avaliação da expressão do miR-155/Mef2a⁸⁹ e do miR-186/Myog⁷⁶.

Para testar a hipótese de que o miR-155 é um regulador pós-transcricional da expressão da Ogn e que, essa regulação possui uma consequência funcional no desenvolvimento das células musculares esqueléticas, nós testamos a interação entre o miR-155 e a região 3'UTR da Ogn. Utilizando o algoritmo *TargetScan*, identificamos uma possível interação entre a região 3'UTR da Ogn e a “seed region” do miR-155. Para validarmos essa interação, utilizamos ensaio de luciferase, no qual a sequência 3'UTR da Ogn foi clonada em um plasmídeo pmiRGlo e, posteriormente, co-transfectado com o miR-155. Essa co-transfecção diminuiu os níveis da luciferase *firefly* (Figura 8C), indicando a interação entre a região 3'UTR da Ogn e o miR-155. Para completar esses achados, realizamos a transfecção do miR-155 em células C2C12, a qual induziu uma diminuição nos níveis de expressão gênica e proteica da Ogn (Figura 9A e 9B). Não há nenhum trabalho que mostre essa interação, e nossos dados demonstram que há uma forte interação e regulação da Ogn pelo miR-155 através da região 3'UTR da Ogn em células C2C12. Além disso, essa ação do miR-155 regulando os níveis de expressão da Ogn é condizente com relevantes estudos os quais demonstraram que a maioria dos miRNAs atuam predominantemente degradando seus mRNAs alvos^{52,107,108}.

MicroRNA miR-155 altera os processos iniciais da miogênese esquelética

Para testarmos o envolvimento do miR-155 na regulação da miogênese, realizamos inicialmente a transfecção do oligonucleotídeo mimético do miR-155 nos mioblastos indiferenciados, a qual acarretou um aumento na expressão gênica da miogenina (Figura 10A). A miogenina é um marcador de miogênese caracterizado por atuar nos estágios tardios da miogênese e não é necessária para os eventos iniciais desse processo^{1,109}. Sendo assim, nossos dados sugerem que o aumento da miogenina nos mioblastos C2C12 transfectados com miR-155 encerra o processo de proliferação

dessas células precocemente. Para complementar esses dados, quantificamos a taxa de proliferação desses mioblastos transfectados com o miR-155 utilizando o ensaio de *MTT*. Verificamos que essa transfecção diminuiu a proliferação dos mioblastos após 36 horas (Figura 15), corroborando com os dados de expressão da miogenina obtidos pela RT-qPCR do presente trabalho. Entretanto, não há na literatura resultados descrevendo o papel da Ogn na proliferação de mioblastos C2C12; porém, recentemente Xing *et al.*¹¹⁰ 2015 demonstraram que o *knockdown* do proteoglicano *biglycan* diminuiu a proliferação na linhagem celular de câncer de cólon HCT116. Considerando que a Ogn é um proteoglicano que pertence à mesma família do *biglycan*, podemos inferir que diferentes proteoglicanos possuem importância no processo de proliferação celular.

Para verificar se os mioblastos transfectados com o miR-155 também apresentam alteração no processo de migração celular, realizamos o ensaio de *Wound Healing* como descrito por Grzelkowska-Kowalczyk *et al.* 2015¹⁰⁴. O *Wound Healing* revelou que as células transfectadas com o miR-155 apresentaram uma menor migração após 24 h e 48 h (Figura 14). Sabe-se que a interação entre diversos fatores da matriz extracelular é necessária para a migração adequada de células musculares. Durante a miogênese, os fatores migratórios ou componentes do secretoma são secretados para o controle da migração celular durante o processo de fusão dos miotubos^{111–115}. Além disso, Goetsch *et al.* 2011¹¹⁶ mostraram que fatores da matriz extracelular estimulam a migração dos mioblastos C2C12, corroborando com os nossos dados que demonstraram que a possível repressão da tradução da Ogn, um importante componente do secretoma de células musculares, pelo miR-155 (*mimic*) diminuiu a migração dos mioblastos C2C12. Portanto, nossos resultados mostraram que o aumento da expressão do miR-155, além de alterar o processo de proliferação, também diminuiu a migração das

células C2C12, sugerindo uma possível via de regulação da migração de células musculares via miR-155, regulador do proteoglicano Ogn.

miR-155 altera a diferenciação dos mioblastos esqueléticos

Para testarmos se o miR-155 está envolvido na regulação da diferenciação dos mioblastos, inicialmente avaliamos por RT-qPCR os marcadores moleculares da miogênese em miotubos transfectados com miR-155 e encontramos uma diminuição na expressão gênica de Myh2 (Figura 10B). Também encontramos diminuição dos níveis proteicos de Myh2 nos miotubos após a transfecção do miR 155-*mimic* (Figura 11B e Tabela 3). Esses dados foram complementados com dados morfométricos obtidos após marcação das proteínas utilizando-se a técnica de imunofluorescência; esses dados demonstraram que a transfecção do miR 155-*mimic* induz menor formação de miotubos. Ainda, utilizando os dados de imunofluorescência, analisamos o índice de fusão dos mioblastos e os resultados mostraram que: 1) o miR-155 possui uma importante função no processo de diferenciação dos mioblastos em miotubos e; 2) o aumento dessa molécula em mioblastos diminui a formação de miotubos musculares. Nossos resultados são semelhantes aos obtidos por Seok *et al.* 2011⁸⁹ que mostraram uma inibição da diferenciação dos mioblastos após a superexpressão do miR-155 identificada pela diminuição do tamanho e do número de miotubos, além de alterar os marcadores moleculares da miogênese.

Ogn altera a miogênese esquelética

Após os ensaios com o miR-155, avaliamos se a repressão da Ogn causaria uma consequência funcional nos processos da miogênese. A Ogn endógena dos mioblastos foi silenciada através de oligonucleotídeos siRNA específicos para Ogn, a qual acarretou um decréscimo na proliferação dos mioblastos após 12h e 24h, observado pelo

ensaio de *MTT* (Figura 15), sugerindo que a Ogn possua uma importante função nos estágios iniciais da miogênese. Além disso, o *knockdown* da Ogn, nos miotubos, desencadeou uma diminuição na expressão gênica dos marcadores moleculares da miogênese (Figura 10B), confirmando a hipótese de que a Ogn é um importante elemento para o desenvolvimento do músculo esquelético. Atualmente, estamos realizando imunofluorescência para a proteína Myh2 para corroborar com os dados de expressão gênica que mostram que o *knockdown* da Ogn altera a formação dos miotubos nesse estudo. Esses dados para a formação de miotubos estão de acordo aos obtidos por Chan *et al.* 2011¹⁸ que verificaram que o *knockdown* da Ogn diminuiu a diferenciação dos mioblastos, comprovada pela menor atividade transcricional da Mck (*muscle creatine kinase*). Porém, os autores não avaliaram os marcadores moleculares da miogênese (Myod, Myog e Myh2) e não realizaram ensaios para verificar quais processos da miogênese inicial são influenciados pela Ogn. Sendo assim, nossos dados sugerem que a Ogn altera a proliferação e diferenciação dos mioblastos, com alteração dos marcadores moleculares da miogênese (Myod, Myog e Myh2).

6. Conclusões

Nossos resultados indicam que a Ogn é um alvo direto do miR-155 e estudos funcionais demonstraram que ambos, miR-115 e Ogn, possuem importantes funções nos processos de proliferação, migração e diferenciação dos mioblastos durante a miogênese. Esses resultados sugerem uma nova via de regulação da miogênese, na qual o miR-155 pode atuar nos processos de proliferação, migração e diferenciação de células musculares C2C12 via Ogn.

7. Referências

1. Bentzinger, C. F., Wang, Y. X. & Rudnicki, M. A. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**, (2012).
2. Weintraub, H. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* **75**, 1241–4 (1993).
3. Naya, F. J. & Olson, E. MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Current opinion in cell biology* **11**, 683–8 (1999).
4. Megeney, L. A. & Rudnicki, M. A. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **73**, 723–32
5. Salvatore, D., Simonides, W. S., Dentice, M., Zavacki, A. M. & Larsen, P. R. Thyroid hormones and skeletal muscle--new insights and potential implications. *Nature reviews. Endocrinology* **10**, 206–14 (2014).
6. Braun, T. & Gautel, M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 349–61 (2011).
7. Massari, M. E. & Murre, C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Molecular and cellular biology* **20**, 429–40 (2000).
8. Buckingham, M. & Rigby, P. W. J. Gene Regulatory Networks and Transcriptional Mechanisms that Control Myogenesis. *Developmental cell* **28**, 225–238 (2014).
9. Capers, C. R. Multinucleation of skeletal muscle in vitro. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* **7**, 559–66 (1960).
10. Stockdale, F. E. & Holtzer, H. DNA synthesis and myogenesis. *Experimental cell research* **24**, 508–20 (1961).
11. Goulding, M., Lumsden, A. & Paquette, A. J. Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development (Cambridge, England)* **120**, 957–71 (1994).
12. Williams, B. A. & Ordahl, C. P. Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development (Cambridge, England)* **120**, 785–96 (1994).
13. Amthor, H., Christ, B. & Patel, K. A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth - a balance between proliferation and differentiation. *Development (Cambridge, England)* **126**, 1041–53 (1999).

14. Chargé, S. B. P. & Rudnicki, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological reviews* **84**, 209–38 (2004).
15. Bischoff, R. A satellite cell mitogen from crushed adult muscle. *Developmental biology* **115**, 140–7 (1986).
16. Bischoff, R. Interaction between satellite cells and skeletal muscle fibers. *Development (Cambridge, England)* **109**, 943–52 (1990).
17. Pedersen, B. K. & Febbraio, M. A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological reviews* **88**, 1379–406 (2008).
18. Chan, C. Y. X. *et al.* Identification of differentially regulated secretome components during skeletal myogenesis. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **10**, 1–20 (2011).
19. Tanaka, K. *et al.* Role of osteoglycin in the linkage between muscle and bone. *The Journal of biological chemistry* **287**, 11616–28 (2012).
20. Barrett, T. *et al.* NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic acids research* **41**, D991–5 (2013).
21. Bentz, H. *et al.* Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone. *The Journal of biological chemistry* **264**, 20805–10 (1989).
22. Hu, S.-M. *et al.* The mimecan gene expressed in human pituitary and regulated by pituitary transcription factor-1 as a marker for diagnosing pituitary tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **90**, 6657–64 (2005).
23. Funderburgh, J. L. *et al.* Mimecan, the 25-kDa corneal keratan sulfate proteoglycan, is a product of the gene producing osteoglycin. *The Journal of biological chemistry* **272**, 28089–95 (1997).
24. Tasheva, E. S., Corpuz, L. M., Funderburgh, J. L. & Conrad, G. W. Differential splicing and alternative polyadenylation generate multiple mimecan mRNA transcripts. *The Journal of biological chemistry* **272**, 32551–6 (1997).
25. Tasheva, E. S., Maki, C. G., Conrad, A. H. & Conrad, G. W. Transcriptional activation of bovine mimecan by p53 through an intronic DNA-binding site. *Biochimica et biophysica acta* **1517**, 333–8 (2001).
26. Madisen, L. *et al.* Molecular cloning of a novel bone-forming compound: osteoinductive factor. *DNA and cell biology* **9**, 303–9 (1990).
27. Tasheva, E. S. *et al.* Mimecan/osteoglycin-deficient mice have collagen fibril abnormalities. *Molecular vision* **8**, 407–15 (2002).
28. Jazbutyte, V. *et al.* MicroRNA-22 increases senescence and activates cardiac fibroblasts in the aging heart. *Age (Dordrecht, Netherlands)* **35**, 747–62 (2013).

29. 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).
30. Ge, Y. & Chen, J. MicroRNAs in skeletal myogenesis. *Cell Cycle* **10**, 441–448 (2011).
31. Williams, A. H., Liu, N., van Rooij, E. & Olson, E. N. MicroRNA control of muscle development and disease. *Current opinion in cell biology* **21**, 461–9 (2009).
32. Ambros, V. A uniform system for microRNA annotation. *Rna* **9**, 277–279 (2003).
33. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* **23**, 4051–60 (2004).
34. 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).
35. Kim, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 376–85 (2005).
36. Borchert, G. M., Lanier, W. & Davidson, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology* **13**, 1097–101 (2006).
37. 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).
38. Gregory, R. I. *et al.* The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**, 235–40 (2004).
39. Han, J. *et al.* The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development* **18**, 3016–27 (2004).
40. 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).
41. 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).
42. Han, J. *et al.* Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* **125**, 887–901 (2006).

43. Berezikov, E., Chung, W., Willis, J., Cuppen, E. & Lai, E. C. Mammalian mirtron genes. *Molecular cell* **28**, 328–36 (2007).
44. 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).
45. Ruby, J. G., Jan, C. H. & Bartel, D. P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* **448**, 83–6 (2007).
46. 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).
47. Bohnsack, M. T. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* **10**, 185–191 (2004).
48. 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).
49. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 126–39 (2009).
50. Schwarz, D. S. *et al.* Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199–208 (2003).
51. 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).
52. Lim, L. P. *et al.* Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**, 769–73 (2005).
53. Lee, Y. S. & Dutta, A. MicroRNAs in cancer. *Annual review of pathology* **4**, 199–227 (2009).
54. 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).
55. Campos, V. F., Urtiaga, G., Gonçalves, B., Deschamps, J. C. & Collares, T. MicroRNAs e seu papel no desenvolvimento embrionário. *Ciência Rural* **41**, 85–93 (2011).
56. Doench, J. G. & Sharp, P. A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & development* **18**, 504–11 (2004).
57. Esau, C. *et al.* miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell metabolism* **3**, 87–98 (2006).

58. Leung, A. K. L. & Sharp, P. a. microRNAs: a safeguard against turmoil? *Cell* **130**, 581–5 (2007).
59. Latronico, M. V. G., Catalucci, D. & Condorelli, G. Emerging role of microRNAs in cardiovascular biology. *Circulation research* **101**, 1225–36 (2007).
60. Thum, T., Catalucci, D. & Bauersachs, J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovascular research* **79**, 562–70 (2008).
61. Van Rooij, E., Liu, N. & Olson, E. N. MicroRNAs flex their muscles. *Trends in genetics : TIG* **24**, 159–66 (2008).
62. 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).
63. Chen, J.-F. *et al.* The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature genetics* **38**, 228–33 (2006).
64. 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).
65. 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).
66. 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).
67. 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).
68. 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).
69. 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).
70. 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).
71. Greco, S. *et al.* Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *The*

72. Sempere, L. F. *et al.* Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome biology* **5**, R13 (2004).
73. Sokol, N. S. & Ambros, V. Mesodermally expressed *Drosophila* microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. *Genes & development* **19**, 2343–54 (2005).
74. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A. & Tuschl, T. New microRNAs from mouse and human. *RNA (New York, N.Y.)* **9**, 175–9 (2003).
75. Grünhagen, J. & Ott, C.-E. On microRNA-214 suppressing osteogenic differentiation of C2C12 myoblast cells by targeting Osterix. *Bone* **57**, 325–7 (2013).
76. Antoniou, A., Mastroiannopoulos, N. P., Uney, J. B. & Phylactou, L. A. miR-186 inhibits muscle cell differentiation through myogenin regulation. *The Journal of biological chemistry* **289**, 3923–35 (2014).
77. 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).
78. Kałużna, E. M. MicroRNA-155 and microRNA-196b: promising biomarkers in hepatitis C virus infection? *Reviews in medical virology* **24**, 169–85 (2014).
79. Faraoni, I., Antonetti, F. R., Cardone, J. & Bonmassar, E. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochimica et biophysica acta* **1792**, 497–505 (2009).
80. Tili, E., Croce, C. M. & Michaille, J.-J. miR-155: on the crosstalk between inflammation and cancer. *International reviews of immunology* **28**, 264–84 (2009).
81. Dorsett, Y. *et al.* MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation. *Immunity* **28**, 630–8 (2008).
82. Vigorito, E. *et al.* microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity* **27**, 847–59 (2007).
83. Forrest, A. R. R. *et al.* Induction of microRNAs, mir-155, mir-222, mir-424 and mir-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation. *Leukemia* **24**, 460–6 (2010).
84. Xie, Q. *et al.* Aberrant expression of microRNA 155 may accelerate cell proliferation by targeting sex-determining region Y box 6 in hepatocellular carcinoma. *Cancer* **118**, 2431–42 (2012).

85. Seok, H. Y. *et al.* Loss of MicroRNA-155 protects the heart from pathological cardiac hypertrophy. *Circulation research* **114**, 1585–95 (2014).
86. Corsten, M. F. *et al.* MicroRNA profiling identifies microRNA-155 as an adverse mediator of cardiac injury and dysfunction during acute viral myocarditis. *Circulation research* **111**, 415–25 (2012).
87. Heymans, S. *et al.* Macrophage microRNA-155 promotes cardiac hypertrophy and failure. *Circulation* **128**, 1420–32 (2013).
88. 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).
89. Seok, H. Y. *et al.* miR-155 inhibits expression of the MEF2A protein to repress skeletal muscle differentiation. *The Journal of biological chemistry* **286**, 35339–46 (2011).
90. Hu, Y. *et al.* Epitranscriptional orchestration of genetic reprogramming is an emergent property of stress-regulated cardiac microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 19864–9 (2012).
91. Meyer, S. U. *et al.* Integrative Analysis of MicroRNA and mRNA Data Reveals an Orchestrated Function of MicroRNAs in Skeletal Myocyte Differentiation in Response to TNF- α or IGF1. *PloS one* **10**, e0135284 (2015).
92. Yaffe, D. & Saxel, O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* **270**, 725–727 (1977).
93. Panguluri, S. K. *et al.* Genomic profiling of messenger RNAs and microRNAs reveals potential mechanisms of TWEAK-induced skeletal muscle wasting in mice. *PloS one* **5**, e8760 (2010).
94. Bhatnagar, S. *et al.* Tumor necrosis factor- α regulates distinct molecular pathways and gene networks in cultured skeletal muscle cells. *PloS one* **5**, e13262 (2010).
95. Di Marco, S. *et al.* NF-kappa B-mediated MyoD decay during muscle wasting requires nitric oxide synthase mRNA stabilization, HuR protein, and nitric oxide release. *Molecular and cellular biology* **25**, 6533–45 (2005).
96. Stevenson, E. J., Koncarevic, A., Giresi, P. G., Jackman, R. W. & Kandarian, S. C. Transcriptional profile of a myotube starvation model of atrophy. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **98**, 1396–406 (2005).
97. Boudoukha, S. *et al.* MiRNA let-7g regulates skeletal myoblast motility via Pinch-2. *FEBS letters* (2014). doi:10.1016/j.febslet.2014.02.057

98. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* **55**, 611–22 (2009).
99. 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).
100. 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).
101. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248–54 (1976).
102. 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).
103. Geraldo, M. V. Regulação da via de sinalização de TGF- β pelo microRNA miR-146b-5p no câncer de tireóide. (2012).
104. Grzelkowska-Kowalczyk, K. *et al.* Transcriptional regulation of important cellular processes in skeletal myogenesis through interferon- γ . *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **35**, 89–99 (2015).
105. Chen, J.-F. *et al.* microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *The Journal of cell biology* **190**, 867–79 (2010).
106. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **65**, 55–63 (1983).
107. Baek, D. *et al.* The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **455**, 64–71 (2009).
108. Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S. & Bartel, D. P. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**, 835–840 (2010).
109. Venuti, J. M., Morris, J. H., Vivian, J. L., Olson, E. N. & Klein, W. H. Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *The Journal of cell biology* **128**, 563–76 (1995).
110. Xing, X., Gu, X. & Ma, T. Knockdown of biglycan expression by RNA interference inhibits the proliferation and invasion of, and induces apoptosis in, the HCT116 colon cancer cell line. *Molecular medicine reports* **12**, 7538–44 (2015).

111. Griffin, C. A., Apponi, L. H., Long, K. K. & Pavlath, G. K. Chemokine expression and control of muscle cell migration during myogenesis. *Journal of cell science* **123**, 3052–60 (2010).
112. Echtermeyer, F., Schöber, S., Pöschl, E., von der Mark, H. & von der Mark, K. Specific induction of cell motility on laminin by alpha 7 integrin. *The Journal of biological chemistry* **271**, 2071–5 (1996).
113. Lluri, G. & Jaworski, D. M. Regulation of TIMP-2, MT1-MMP, and MMP-2 expression during C2C12 differentiation. *Muscle & nerve* **32**, 492–9 (2005).
114. Ocalan, M., Goodman, S. L., Köhl, U., Hauschka, S. D. & von der Mark, K. Laminin alters cell shape and stimulates motility and proliferation of murine skeletal myoblasts. *Developmental biology* **125**, 158–67 (1988).
115. Olguin, H. C., Santander, C. & Brandan, E. Inhibition of myoblast migration via decorin expression is critical for normal skeletal muscle differentiation. *Developmental biology* **259**, 209–24 (2003).
116. Goetsch, K. P., Kallmeyer, K. & Niesler, C. U. Decorin modulates collagen I-stimulated, but not fibronectin-stimulated, migration of C2C12 myoblasts. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology* **30**, 109–17 (2011).

8. Material Suplementar

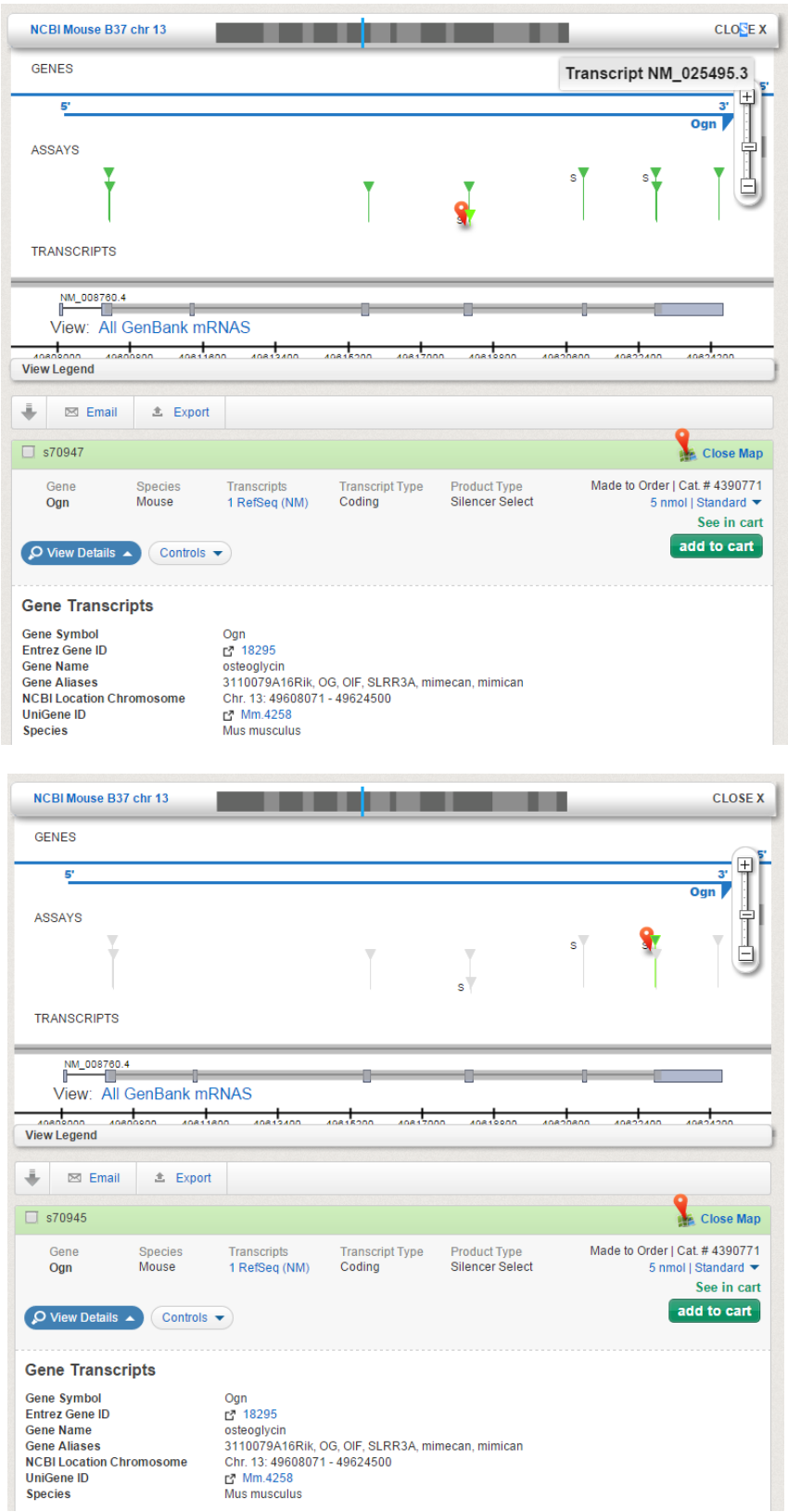


Figura Suplementar 1. Sequências de Silencer® Select siRNA

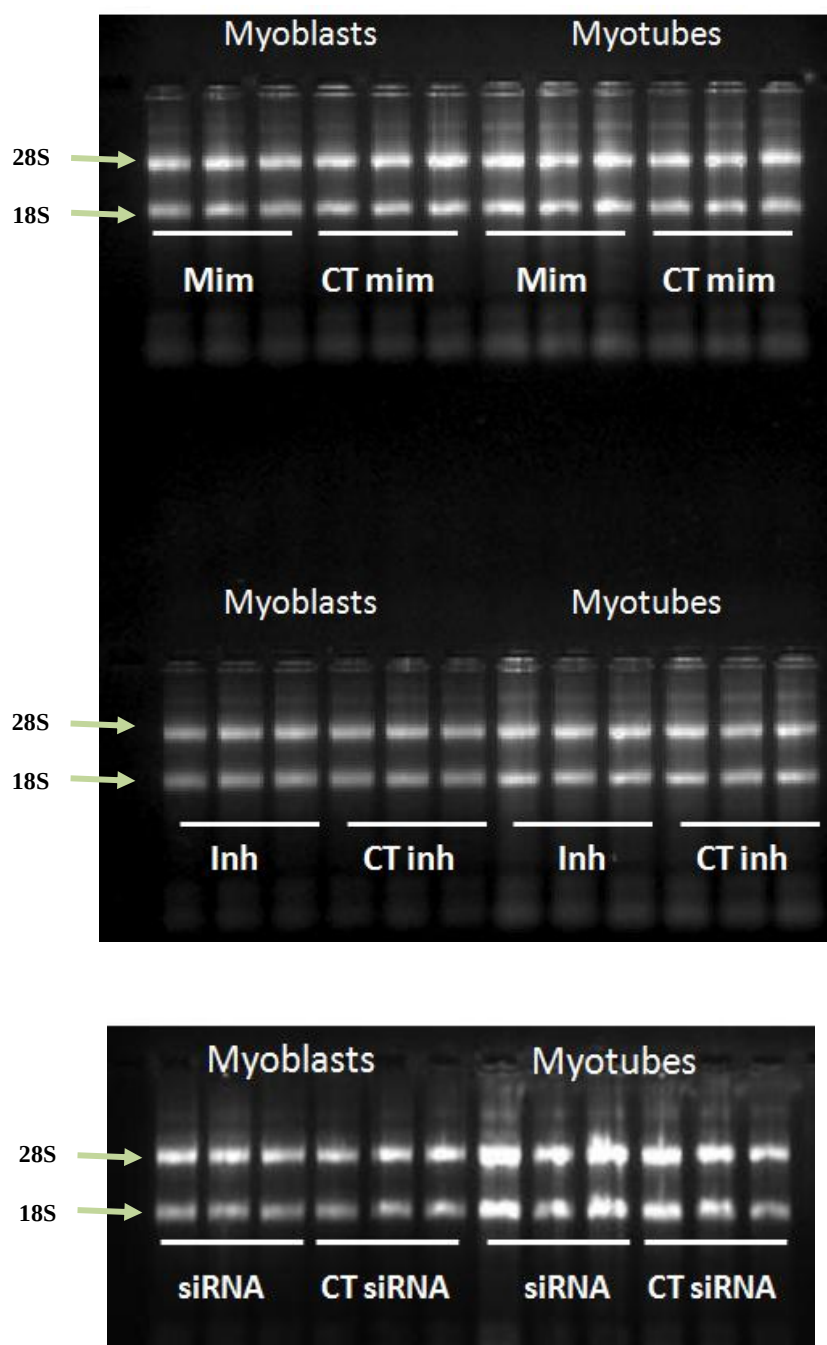
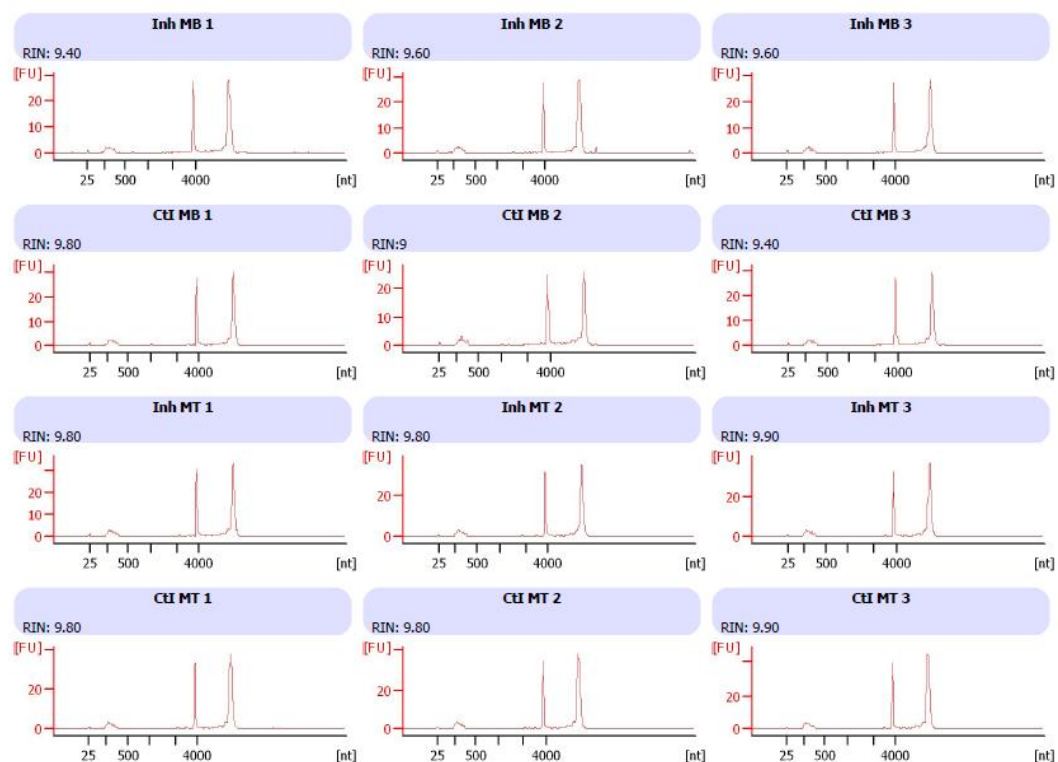
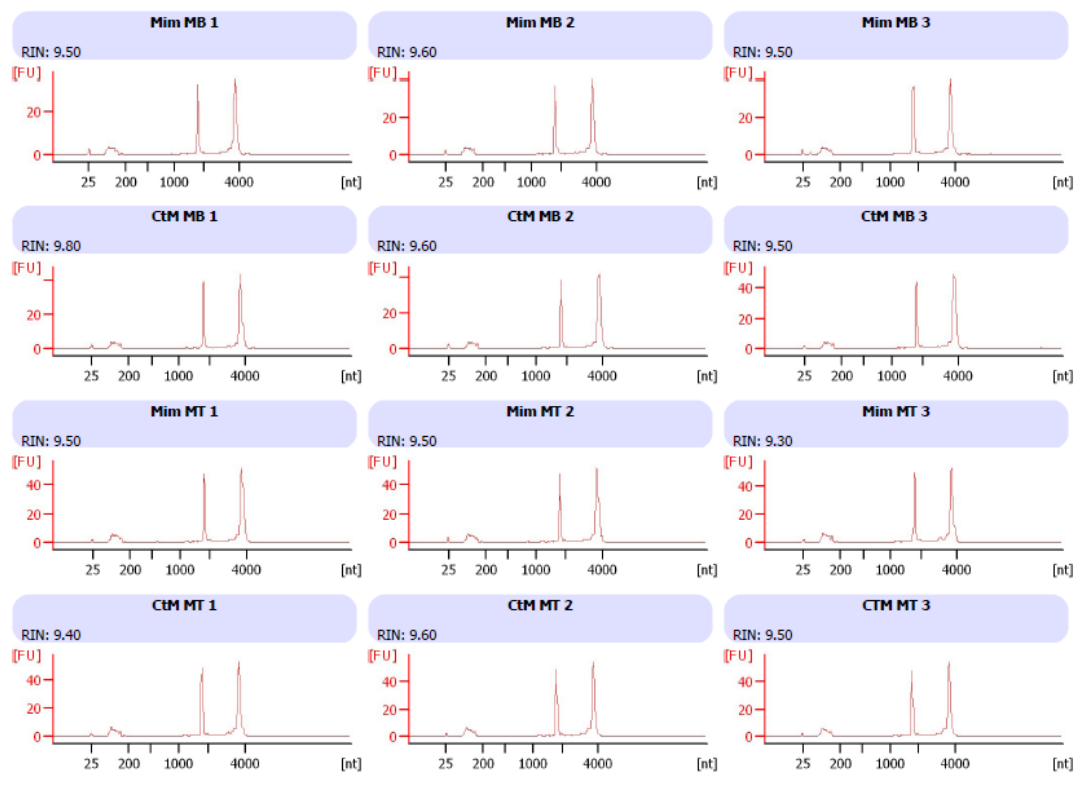


Figura Suplementar 2. Fotos das bandas 28S e 18S de amostras representativas dos 6 grupos experimentais (Mim: *mimic* do miR-155; CT-mim: controle negativo do *mimic* do miR-155; Inh: *inhibitors* do miR-155; CT- inh: controle negativo do *inhibitor* do miR-155; siRNA: siRNA da Ogn; CT-siRNA: controle negativo do siRNA da Ogn) obtidas através do gel analítico de agarose.



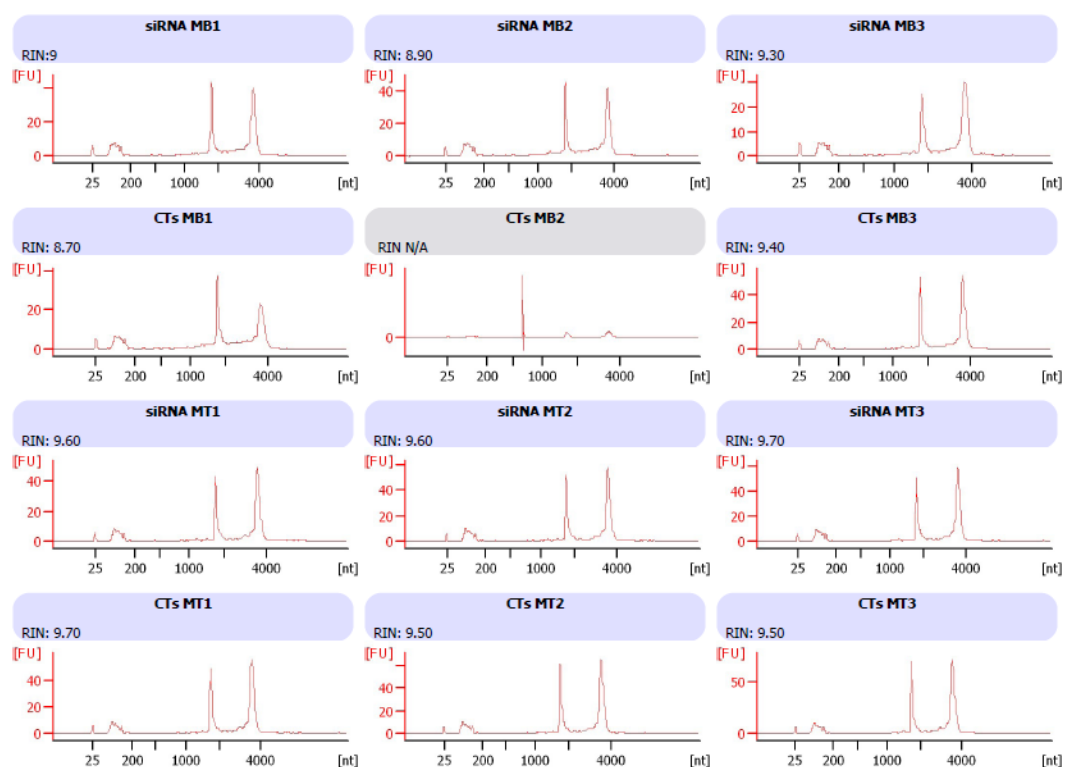


Figura Supplementar 3. Eletroferograma das amostras de RNA. MB: mioblastos; MT: miotubos; Mim: *mimic* do miR-155; CTM: controle negativo para *mimic*; Inh: inibidor do miR-155; CTI: controle negativo para *inhibitor*; siRNA: siRNA da Ogn; CTs: controle negativo para siRNA. Valor de *RIN* – *RNA Integrity Number* obtido no aparelho *Agilent 2100 Bioanalyser*.

Amostra	[RNA]	260/280	260/230	RIN
Mim MB1	338,0	1,99	2,20	9,5
Mim MB2	365,2	1,99	2,20	9,6
Mim MB3	354,8	1,99	2,15	9,5
CTm MB1	340,0	1,99	2,00	9,8
CTm MB2	338,8	1,99	2,10	9,6
CTm MB3	342,8	1,98	2,22	9,5
Mim MT1	499,6	1,98	2,20	9,5
Mim MT2	538,8	1,98	2,10	9,5
Mim MT3	512,0	1,99	2,10	9,3
CTm MT1	461,6	1,98	2,10	9,4
CTm MT2	462,4	1,99	2,20	9,6
CTm MT3	469,6	1,99	2,20	9,5
Inh MB1	324,8	1,97	2,20	9,4
Inh MB2	311,6	1,98	2,20	9,6
Inh MB3	354,8	1,97	2,20	9,6
CTi MB1	339,7	1,98	2,20	9,8
CTi MB2	329,6	1,99	2,20	9,0
CTi MB3	293,6	1,98	2,10	9,4
Inh MT1	506,4	1,97	2,10	9,8
Inh MT2	503,6	1,98	2,20	9,8
Inh MT3	491,6	1,98	2,20	9,9
CTi MT1	502,0	1,96	2,30	9,8
CTi MT2	482,8	1,99	2,20	9,8
CTi MT3	487,6	1,98	2,20	9,9
siOgn MB1	369,6	1,98	2,17	9,0
siOgn MB2	335,6	1,90	2,10	8,9
siOgn MB3	380,8	1,79	2,30	9,3
CTsi MB1	357,2	2,00	2,10	8,7
CTsi MB2	352,8	1,90	2,10	-
CTsi MB3	349,2	1,99	2,20	9,4
siOgn MT1	613,2	1,98	2,10	9,6
siOgn MT2	634,8	1,90	2,10	9,6
siOgn MT3	642,8	1,90	2,10	9,7
CTsi MT1	498,4	1,90	2,10	9,7
CTsi MT2	486,4	1,90	2,10	9,5
CTsi MT3	364,4	2,00	2,10	9,5

Figura suplementar 4. Quantificação do RNA total (ng/ul) e *RNA Integrity Number* (RIN)

	1102025
Consensus	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
Identity	
1. tch-miR-155-5p	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
2. chi-miR-155-5p	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
3. efu-miR-155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGUUU
4. ssa-miR-155-5p	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
5. rno-miR-155-5p	UUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGGU
6. ipu-miR-155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGUU
7. ccr-miR-155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGG
8. ggo-miR-155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGG
9. cgr-miR-155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGG
10. ssc-miR-155-5p	UUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGG
11. aca-miR-155-5p	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGG
12. ppy-miR-155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
13. tgu-miR-155-5p	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGG
14. eca-miR-155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
15. bta-miR-155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
16. ptr-miR-155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
17. oan-miR-155-5p	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
18. cfa-miR-155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
19. mml-miR-155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
20. xtr-miR-155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGG
21. dre-miR-155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGG
22. gga-miR-155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGG
23. hsa-miR-155-5p	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
24. mmu-miR-155-5p	UUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGGU

Figura suplementar 5. Alinhamento da sequência do miR-155 em diferentes espécies.

9. Publicações e Prêmios

Artigos Publicados

Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Silva DCT, Nascimento AF, Luvizotto RAM, Deus AF, **Freire PP**, Medeiros A, Cicogna AC. Long-term obesity promotes alterations in diastolic function induced by reduction of phospholamban phosphorylation serine16 without affecting calcium handling. *Journal of Applied Physiology*. 117(6):669-78 (2014).

Freire PP, Alves CAB, Deus AF, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Silva DCT, Tomasi LCD, Campos DHS, Padovani CR, Cicogna AC. Obesity does not lead to imbalance between myocardial phospholamban phosphorylation and dephosphorylation. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 103(1):41-50 (2014).

Artigo Aceito para Publicação

Silva DCT, Tomasi LCD, Campos DHS, Alves CAB, **Freire PP**, Deus AF, Padovani CR, Cicogna AC. Decreased myocardial type I collagen in obese rats fed an unsaturated high-fat diet is associated with increased metalloproteinase -2 and -9 activity. *British Journal of Nutrition*.

Artigos Submetidos

Conti BJ, Santiago KB, Cardoso E, **Freire PP**, Golim MA, Carvalho RF, Sforcin JM. Propolis modulates miRNAs involved in TLR-4 pathway, NF- κ B activation, cytokine production and in the bactericidal activity of human dendritic cells. *Molecular Immunology*. (Submetido em setembro de 2015)

Mazeto C, Silva DCT, **Freire PP**, Deus AF, Okoshi K, Padovani CR, Cicogna AC. SERCA2A participation in early isolated diastolic dysfunction induced by supralvalvar aortic stenosis in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. (Submetido em setembro de 2015)

Capítulo de Livro Publicado

Deus AF, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Alves CAB, Mazeto CFS, Silva DCT, Campos DHS, Tomasi LCD, **Freire PP**, Cicogna AC. Bomba de Cálcio do Retículo Sarcoplasmático (SERCA) e Bomba de Cálcio da Membrana Plasmática (PMCA). In: Sinalização de Cálcio: Bioquímica e Fisiologia Celulares ed : Sarvier, 2012

Menções Honrosas

I Congresso de Biociências

Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Apresentação Painel: “Avaliação das Proteínas Responsáveis pela Fosforilação e Desfosforilação da Fosfolambam na Obesidade”

Prêmio Lucien Lison de Iniciação Científica

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Apresentação Oral: “Perfil global de expressão de microRNAs na caquexia associada à insuficiência cardíaca.”

FeSBE 2015

Faculdade de Medicina de São Paulo - USP

Apresentação Painel: “MicroRNA miR-155 inhibits expression of the osteoglycin protein to regulate C2C12 myogenesis.”



Certificamos que

O Trabalho 10.021 MICRORNA MIR-155 INHIBITS EXPRESSION OF THE OSTEOGLYCIN PROTEIN TO REGULATE C2C12 MYOGENESIS de autoria Freire, P. P. , Oliveira, G. , Moraes, L. N. , Cury, S. S. , Fernandez, G. J. , Ferreira, J. H. , Dal-pai-silva, M. , Carvalho, R. F. , Departamento de Morfologia - IBB-UNESP, foi contemplado com Menção Honrosa pela brilhante apresentação na

XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizada na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em São Paulo - SP, de 09 a 12 de setembro de 2015.


Comissão Organizadora

