



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



PG-BGA

Regulação da Osteoglicina pelo microRNA-22 durante a miogênese

CARLOS AUGUSTO BARNABE ALVES

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, Área de concentração Biologia celular estrutural e funcional.

Orientadora: Profa. Dra. Maeli Dal Pai

**BOTUCATU – SP
2016**



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



PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

REGULAÇÃO DA OSTEOLICINA PELO MICRORNA-22 DURANTE A MIOGÊNESE

CARLOS AUGUSTO BARNABE ALVES

ORIENTADORA: MAELI DAL PAI

CO-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, Área de concentração
Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Orientadora: Profa. Dra. Maeli Dal Pai

**BOTUCATU – SP
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Alves, Carlos Augusto Barnabe.

Regulação da Osteoglicina pelo microRNA-22 durante a
miogênese / Carlos Augusto Barnabe Alves. - Botucatu, 2016

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

Orientador: Maeli Dal Pai

Coorientador: Robson Francisco Carvalho

Capes: 20601000

Expressão gênica. Células - Cultura e meios de cultura.
Músculo Esquelético. Matriz extracelular. Ácido
ribonucleico. Genética molecular.

Palavras-chave: Cultura de Células; MicroRNA; Miogênese;
Músculo Esquelético; Osteoglicina.

*À minha mãe, Rosangela e ao meu pai, José Carlos,
por todo o amor e suporte dispensados. Vocês são a minha base mais forte.*

Obrigado por sempre acreditarem em mim.

É de vocês mais essa conquista!

Agradecimento Especial

Aqui agradeço de forma muito especial e emocionada, a Professora Maeli

*Dal Pai, que além de ter sido minha professora durante a graduação, foi
minha orientadora durante todo o mestrado.*

Algumas vezes ultrapassando o limite profissional e me ouvindo como amiga.

A senhora é um exemplo de profissionalismo e ética.

Muito obrigado!

Minha irmã, Anna Kamila, por compartilharmos todos os momentos um na vida do outro. Você é muito importante para mim!

Meus avos, Ana e Sebastião, já falecidos, mas que sempre foram a base da família e que nunca mediram esforços para semear o sentimento de amor e respeito entre os seus. Obrigado!

Meus tios, Jadir, Ana, Jorge e Kátia. Obrigado!

Meus primos, Fernando, Beatriz, Bruna (agora companheira de profissão) e Liana. Obrigado!

O meu co-orientador, Professor Robson Francisco Carvalho, por me orientar na Iniciação Científica e oferecer a oportunidade para que eu pudesse realizar sonhos que sempre tive. Obrigado!

Ao estimado Professor Antonio Carlos Cicogna, que foi o meu primeiro orientador e onde tudo começou. O senhor é meu exemplo de ética. Levarei sempre comigo os seus ensinamentos. Serei eternamente grato. Obrigado!

A minha eterna companheira, Paula Paccielli Freire (Narotcha), por sermos não apenas companheiros de sala de aula e de laboratório, mas por sermos companheiros de vida. Sempre estivemos juntos nessa jornada! Daqui para frente não estaremos mais juntos no laboratório, mas tenha certeza que quero tê-la sempre ao meu lado. Obrigado!

Aos meus amigos de infância, Antonio, Vinícius, Ellen e Daiane. Vocês são parte do que eu sou hoje. Obrigado!

Ao meu amigo de faculdade, Marcos José Teixeira Caetano (Toc), pelos momentos compartilhados. Te considero um irmão. Obrigado!

Ao recente amigo Armando Contin Neto (Detefon) que me ensinou que a vida pode ser mais simples. Obrigado!

Aos amigos da “Sala de Estudo”, Bruno Fantinati, Geysson Fernandez, Ivan Vechetti, Juarez Ferreira, Leonardo Nazário e Tassiana Gutierrez pelas risadas, churrascos e discussões científicas que sempre ocorrem. Obrigado!

Aos colegas e amigos de laboratório Ana Omoto, Bruno Duran, Bruno Martinucci, Edson Mareco, Flávia Constantino, Helga Nunes, Ketlin Colombelli, Rafaela Nunes, Rondinelle Salomão, Sérgio Alcântara dos Santos, Veridiana Carvalho. Obrigado!

Aos alunos de iniciação científica Bruna Zanella, Caroline Bredariol, Francielle Mosele, Guilherme Alcarás, Jéssica Valente, Jéssica Bindo, Maria Laura Kuniyoshi e Sarah Cury. Obrigado!

Aos membros da banca de qualificação e defesa, Professora Maeli Dal Pai, Professor Marcos Ferreira Minicucci, Professora Patrícia Pintor Reis, Professor Renato Ferretti, Professor Robson Francisco Carvalho e Professora

Valéria Sandrim. Suas ideias e sugestões trouxeram questionamentos e ideias importantes para a melhora desta dissertação.

A Professora Edna Kimura (USP) e seu aluno, Doutor César Fuziwara, por abrir as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar o Ensaio de Luciferase. Obrigado!

Aos docentes do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências UNESP – Botucatu. Aqui, em especial, a Professora Flávia Delella por manter o laboratório de Cultura Celular sempre que ordem para que todos nós pudéssemos utilizar. Obrigado!

A todos os funcionários do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu. Obrigado!

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2014/21110-1) pelo financiamento e bolsa concedida.

*I see trees of green, red roses too
I see them bloom for me and you
I see skies so blue and clouds of white
The bright blessed days, the dark sacred night
And I think to myself, what a wonderful world
(Louis Armstrong)*

Sumário

Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução.....	3
1.1 Eventos celulares e moleculares da miogênese	3
1.2 Controle da Miogênese pelo Secretoma do Músculo Esquelético	5
1.3 Osteoglicina (OGN)	7
1.4 MicroRNAs e a Regulação da Expressão Gênica.....	8
1.5 miRNAs e Miogênese	12
2. Objetivos	14
2.1. Objetivo Geral.....	14
2.2. Objetivos Específicos.....	14
3. Material e Métodos.....	15
3.1 Cultura Celular	15
3.1.1. Delineamento Experimental	15
3.2. Transfecção Celular	16
3.3 RT-qPCR.....	17
3.3.1. Extração do RNA	18
3.3.2. Reação de Transcrição Reversa (cDNA para microRNA) e qPCR.....	18
3.3.3 Reação de Transcrição Reversa (cDNA para mRNA) e qPCR	19
3.4 Ensaio de Luciferase	20
3.4.1 Predição dos alvos do miR-22	20
3.4.2 Construção dos vetores pmirGLO-OGN 3'UTR-WT e -Mut	20
3.4.3 Ensaio do gene <i>reporter</i> Luciferase.....	22
3.5 Ensaio de Migração – <i>Wound Healing</i>	23
3.6 <i>Western Blot</i>	23
3.6.1 Extração proteica	23
3.6.2 Eletroforese e <i>Immunoblotting</i>	24
3.6.3 Anticorpos.....	25
3.7 Imunofluorescência.....	25

3.8 Ensaio de Proliferação	26
3.9 Análise estatística dos dados.....	27
4 Resultados	28
4.1 Regulação pós-transcricional da osteoglicina pelo <i>miR-22</i>	28
4.2 Análise da transfecção em mioblastos e miotubos	30
4.3 Superexpressão do <i>miR-22</i> altera a expressão gênica da OGN em mioblastos	30
4.4 Superexpressão do <i>miR-22</i> altera a expressão proteica da OGN em mioblastos	32
4.5 Superexpressão do <i>miR-22</i> não altera a formação dos miotubos	34
4.6 Superexpressão do <i>miR-22</i> aumenta a migração de mioblastos	35
4.7 <i>miR-22</i> aumenta a proliferação de mioblastos	37
5. Discussão.....	38
6. Conclusões	40
7. Referências	41
8. Publicações.....	48
8.1 Artigos publicados	48
8.2 Capítulo de Livro Publicado	48

Resumo

Em mamíferos, a miogênese é o processo de desenvolvimento embrionário do tecido muscular que, a nível molecular, é regulado pela interação de transdutores de sinais intracelulares e fatores de transcrição nucleares. Durante o desenvolvimento do músculo esquelético, as células dos somitos comprometem-se à linhagem miogênica e progridem 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), resultando na reprogramação da expressão gênica responsável pela miogênese esquelética. Os MRFs são importantes para o desenvolvimento muscular, porém não explicam por si só o sofisticado padrão gênico de expressão durante a miogênese. A Osteoglicina (OGN) é um pequeno proteoglicano secretado pela matriz extracelular e que apresenta expressão gênica alterada durante o processo de miogênese. Através de algoritmos computacionais, identificamos o *miR-22* como importante candidato de regulação pós-transcricional da OGN. A hipótese do nosso estudo é que a OGN é regulada pós-transcricionalmente pelo *miR-22* para controle dos processos de migração e diferenciação de células musculares durante a miogênese. Ensaio de Luciferase, RT-qPCR e *Western Blot* mostraram que o *miR-22* inibe a tradução da OGN pela ligação na região 3'UTR da OGN. A transfecção do *mimic* do *miR-22* promoveu aumento de expressão do marcador miogênico miogenina e da taxa de migração e proliferação em mioblastos e aumento de expressão do marcador miogênico MyoD em miotubos. Nossos resultados indicam que o *miR-22* regula pos-transcricionalmente a expressão da OGN controlando os processos de migração, proliferação e diferenciação de células musculares durante a miogênese.

Abstract

In mammals, myogenesis is the process of embryonic development of muscle tissue at the molecular level that is regulated by interaction of intracellular signal transducers and nuclear transcription factors. Somite cells are committed to the myogenic lineage and progress along the development of muscle cells and subsequently formation of multinucleated myofiber. During these processes there is the activation of Myogenic Regulatory Factors (MRFs), resulting in a reprogramming of gene expression responsible for the control of skeletal myogenesis. MRFs are important for muscle development, but they do not explain by themselves the sophisticated pattern of gene expression during myogenesis. The Osteoglycin (OGN) is part of the small proteoglycans that are secreted by the extracellular matrix and presenting gene expression changes during the myogenesis process. Although OGN has been identified as part of the muscle cell secretome, it has not been rated its role in proliferation, migration and, differentiation of muscle cells. Using computer algorithms, we found miR-22 as an important candidate for post-transcriptional regulation of OGN. Thus, the hypothesis is that the OGN is post-transcriptionally regulated by miR-22 for the control of migration and differentiation of muscle cells during myogenesis. Luciferase Assay, RT-qPCR, and Western Blot shows the miR-22 inhibiting the translation by binding to the 3'UTR region of the OGN. Transfection of miR-22 mimic increased myogenic marker expression Myogenin and migration rate in myoblasts and increased the levels of MyoD in myotubes. Our results suggest that miR-22 regulates the expression of OGN, controlling the migration, proliferation and differentiation of muscle cells during myogenesis

1. Introdução

1.1 Eventos celulares e moleculares da miogênese

A miogênese é o processo de desenvolvimento embrionário do tecido muscular, a partir da Mesoderme, que a nível molecular, é regulada 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, diferenciam-se em mioblastos e progridem ao longo da via miogênica através da proliferação e diferenciação e, posteriormente, formação das miofibras multinucleadas (**Figura 1**).

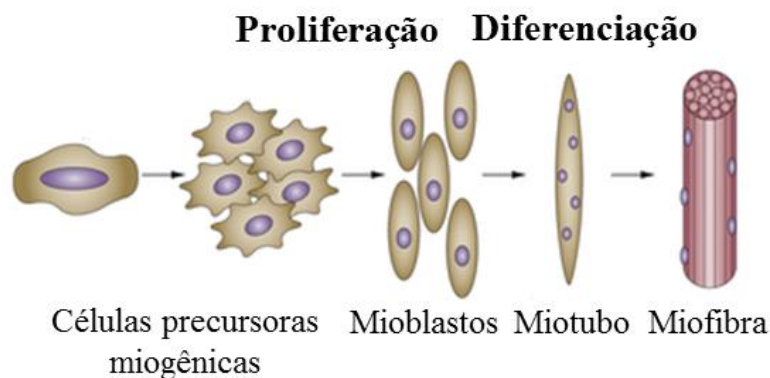


Figura 1. Principais processos da miogênese. Células musculares precursoras mononucleadas, os mioblastos, proliferam e diferenciam-se para formação de fibras musculares adultas. Durante a diferenciação, os mioblastos saem do ciclo celular, migram para regiões pré-determinadas, alinham-se uns com os outros e, subsequentemente, fundem-se para finalmente formarem miotubos multinucleados. Adaptado².

Durante esses processos, há a ativação de fatores miogênicos, resultando numa reprogramação da expressão gênica responsável pela miogênese esquelética^{3,4}.

A determinação e a diferenciação terminal dos mioblastos ocorre a nível transcricional governadas pelas vias regulatórias de quatro fatores de regulação miogênica MRFs: *myogenic factor 5* (MYF5), *muscle-specific regulatory factor 4* (MRF4; também conhecido como MYF6), *myoblast determination protein* (MYOD) e miogenina (Myog)³.

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)⁵. O heterodímero formado possui alta afinidade por uma sequência específica do DNA (5'-CANNTG-3'), conhecida como *E-box*⁵. Essa sequência está presente na região promotora de genes músculo-específicos e a ligação é responsável pela ativação da transcrição desses genes^{1,4}. Esses MRFs são os responsáveis pela indução da proliferação dos mioblastos, células mononucleadas e à diferenciação em miotubos multinucleados^{1,6,7}.

O comprometimento das células somáticas do mesoderma com a linhagem miogênica é marcado pela expressão dos MRFs MYF5 e MYOD; ¹. 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^{8,9}. Já 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 miogênica¹⁰ (**Figura 2**). Os mioblastos que saem do ciclo celular, e que expressam MYF5 e MYOD, tornam-se miócitos diferenciados e iniciam a expressão da (Myog) e do MRF4, os quais regulam a diferenciação dessas células em fibras musculares¹¹

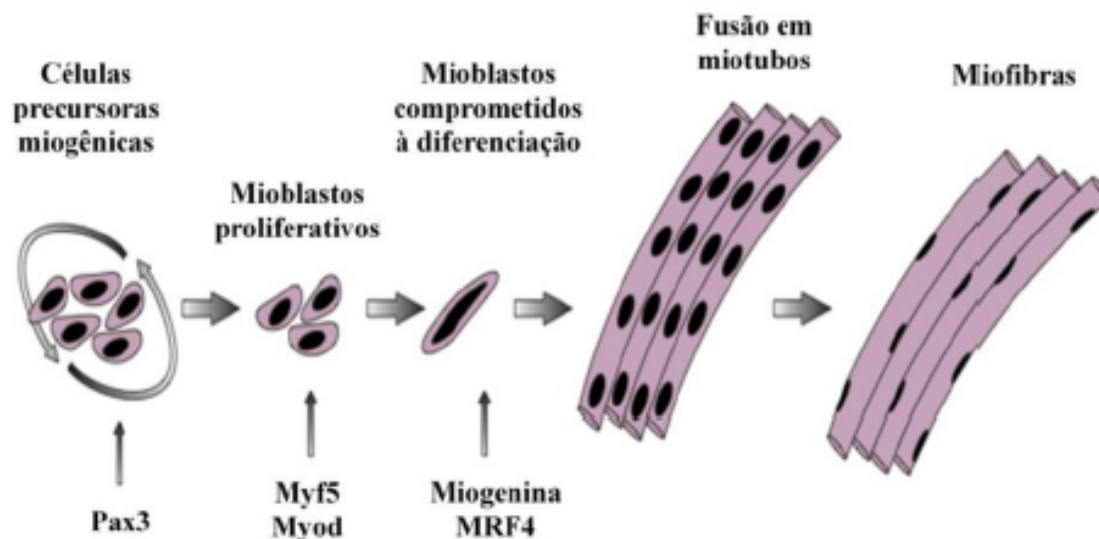


Figura 2. Expressão gênica durante a miogênese. Células precursoras miogênicas começam a expressar PAX3 contribuindo expansão das células miogênicas. Após indução de Myf5 e/ou MyoD as células dos somitos são comprometidas com a linhagem miogênica (mioblastos) iniciando a proliferação dos mioblastos. A expressão de miogenina e MRF4 induz a diferenciação dos mioblastos em miotubos. Posteriormente, os mioblastos se fundem para formar miotubos multinucleados e, em seguida, miofibras maduras. Adaptado¹².

1.2 Controle da Miogênese pelo Secretoma do Músculo Esquelético

Embora os fatores intracelulares que controlam a miogênese estejam estabelecidos, o conhecimento sobre os fatores extracelulares secretados pelas células musculares que regulam o ciclo celular e induzem o processo de diferenciação ainda é escasso. No entanto, dados da literatura mostram que a miogênese é extremamente sensível ao meio extracelular^{13,14} e pode funcionar como órgão endócrino por secretar fatores extracelulares que regulam o desenvolvimento do músculo¹⁵. Tendo em vista essas importantes atuações 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 regeneração do tecido muscular estriado esquelético.

Recentemente, Chan *et al* identificaram 34 proteínas como parte dos componentes do secretoma e, dentre elas, 30 são reguladas diferencialmente durante a miogênese¹⁶. A osteoglicina (OGN) foi a proteína que apresentou uma relevante alteração na sua expressão gênica (mais de 6 vezes) durante o processo de miogênese¹⁶. Os autores também realizaram uma análise da expressão dessa proteína em dois estágios da miogênese, mioblastos e miotubos, e encontraram uma discrepância nos níveis de expressão da OGN nessas duas fases. De modo interessante, quando realizaram o *knockdown* da OGN, verificaram uma diminuição de 1,6 vezes da atividade transcricional da creatina quinase creatina muscular, acompanhada de diminuição na diferenciação dos mioblastos. Esses dados indicam que a OGN é uma importante proteína secretada pelo músculo que influencia os estágios iniciais da miogênese. Além disso, Tanaka *et al* comprovaram que a OGN apresenta uma importante função na regulação de mioblastos em co-cultura com osteoblastos¹⁵. 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 osteoblastos¹⁷.

Os dados sobre a ação da OGN no músculo esquelético ainda são escassos. Entretanto, realizamos em nosso laboratório uma análise do perfil de expressão gênica da OGN utilizando a ferramenta *GEO Profile*¹⁸ que 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 *Gene Expression Omnibus* (GEO). A pesquisa inicial utilizou os seguintes parâmetros para filtro dos dados: 1) OGN no músculo esquelético (termos da busca = “*skeletal*

muscle” and OGN, ou C2C12 and OGN) e 2) OGN com expressão diferencial (filtro da busca: *up/down genes*). Para a busca utilizando “*skeletal muscle and OGN*”, encontramos 14 resultados demonstrando uma 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 “C2C12 and OGN”, encontramos 5 resultados 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 pouco explorados sugerem que a OGN desempenha uma função ainda não descrita em processos como miogênese, regeneração e distrofias.

1.3 Osteoglicina (OGN)

Os MRFs são importantes para o desenvolvimento muscular, porém, não são os únicos que controlam o padrão de expressão gênica durante a miogênese. A determinação e diferenciação dos mioblastos exigem uma ação combinada dos MRFs com outras proteínas que modulam a expressão, localização intracelular e/ou atividade transcricional dos MRFs³.

A OGN, originalmente chamada de fator osteoindutivo (OIF) e, mais tarde, renomeada de mimecan/osteoglicina^{19,20}, é o sétimo membro pertencente à família dos pequenos proteoglicanos secretados na matriz extra-celular²⁰. Sua estrutura proteica é composta por 6-11 de repetições ricas em leucina e possui um peso molecular entre 25 a 60 kDa²¹. O gene da OGN está localizado no cromossomo 9q22 humano²², sua estrutura genômica é altamente conservada entre as espécies, e uma única cópia do gene dá origem a múltiplos transcritos de mRNA resultantes do *splincing* alternativo de poliadenilação diferencial²³. No entanto, todos esses transcritos produzem uma proteína idêntica que é

conservada entre as espécies, indicando a sua importância funcional^{23,24}. A principal função da OGN já descrita está relacionada com a fibrillogênese do colágeno dos tecidos conjuntivos e da matriz óssea^{21,25}.

Embora a OGN já tenha sido identificada como parte do secretoma de células musculares, poucos trabalhos avaliaram a sua função nos processos de proliferação, migração e diferenciação de células musculares. Como a OGN já foi descrita como diferencialmente expressa em mioblastos e miotubos¹⁶, é provável que existem mecanismos pós-transcricionais que regulam a expressão dessa proteína nos diferentes estágios da miogênese. Essa expressão gênica diferencial da OGN entre os estágios de mioblastos e miotubos sugere o envolvimento de uma regulação pós transcricional mediada por micro-RNAs, os quais são elementos-chave no controle do desenvolvimento do músculo esquelético e sua desregulação está envolvida na origem e progressão de várias doenças do músculo²⁶. Em trabalho recente realizado em nosso laboratório, utilizando células C2C12, foi demonstrado que a Ogn é um alvo direto do miR-155 possuindo importante papel nos processos de proliferação, migração e diferenciação dos mioblastos durante a miogênese.

1.4 MicroRNAs e a Regulação da Expressão Gênica

Micro-RNAs (miRNA ou *miR*) 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 maduro²⁷. 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 28.645 miRNAs de 223 espécies estão registrados no banco de dados *miRBase* (v. 21.0); são conhecidos atualmente 2.588 miRNAs humanos (atualizado em abril 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-miRNA. Os pri-miRNAs são preferencialmente transcritos pela RNA polimerase II e mantêm características tais como estrutura de *cap* na sua região 5' e cauda de poli (A) na sua região 3'²⁸⁻³⁰. Entretanto, outras vias geram um conjunto menor de microRNAs, especialmente a partir de repetições genômicas. Por exemplo, a RNA polimerase III é responsável pela transcrição de microRNAs em repetições Alu³¹.

No núcleo, o pri-miRNA é processado para pre-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*)³²⁻³⁵. A DGCR8 forma com a Drosha um grande complexo conhecido como complexo microprocessador, que em humanos possui ~650 kDa³³⁻³⁵. Esse complexo microprocessador reconhece e cliva o pri-microRNA, originando uma molécula com estrutura de *hairpin* de aproximadamente 70 pb, o pré-microRNA^{36,37}. Um subconjunto de miRNAs, conhecidos como miRtrons utiliza uma via alternativa, na qual os pré-miRNA são derivados como produto secundário de um evento de *splicing*, sem a necessidade de processamento pela Drosha³⁸⁻⁴⁰. Após o processamento nuclear, cada pre-miRNAs 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 nuclear⁴¹⁻⁴³. Após a clivagem pela Dicer, a molécula de dupla fita de RNA com aproximadamente 22 nucleotídeos associa-se à proteína Argonauta (Ago) para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC)⁴⁴. 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 (**Figura 3**). Da mesma maneira como ocorre a seleção de um siRNA^{45,46}, a fita que possui sua extremidade 5' formando o duplex mais instável com sua fita parceira parece preferencialmente sobreviver como o miRNA no RISC^{37,45,46}. 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^{47,48}. 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^{47,49}.

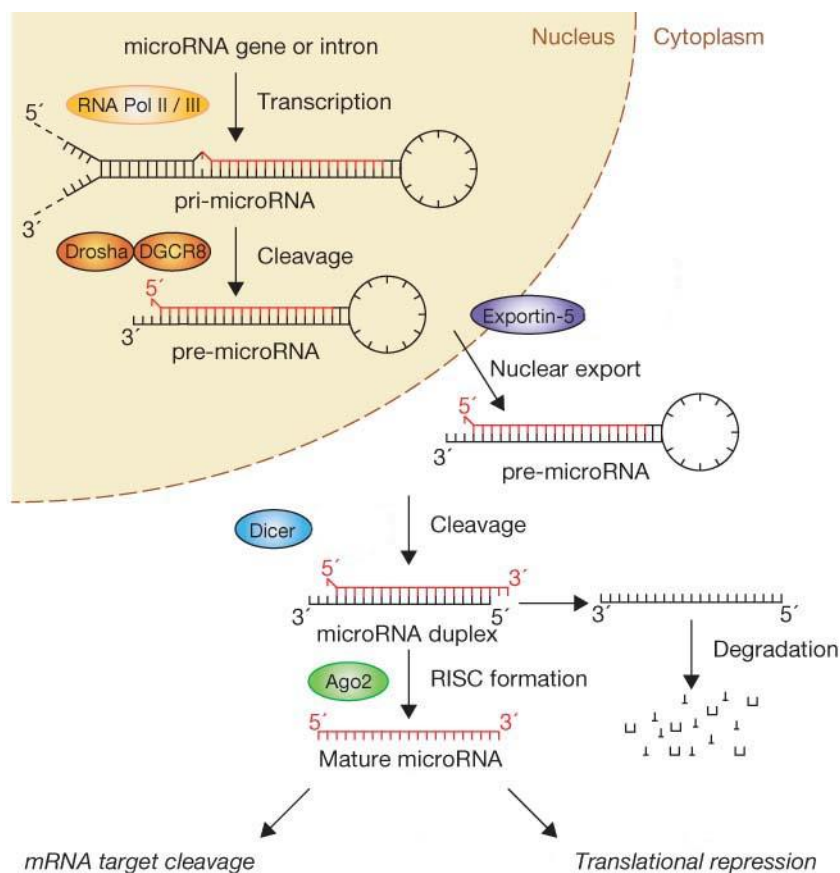


Figura 3. Vias de processamento e mecanismo de ação dos microRNAs. A via de canônica inclui a transcrição de um produto primário (pri-miRNA) pela RNA polimerase II/III e clivagem da molécula pelo complexo *Drosha-DGCR8*. O *hairpin* precursor resultante, o pre-miRNA, é exportado a partir do núcleo pela exportina-5. No citoplasma, o pre-miRNA é clivado pelo complexo *Dicer*, perdendo a configuração em *hairpin*. Forma-se uma molécula de miRNA de fita dupla que se associa à proteína Argonauto 2: uma das fitas é integrada ao complexo de proteínas que reprime a expressão do gene alvo (RISC), enquanto a outra é degradada. O complexo RISC e miRNA promove a degradação ou repressão da tradução do mRNA alvo. Adaptado⁵⁰.

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 miRNA⁵¹. Os miRNAs trabalham de forma orquestrada para controlar uma via ou função biológica comum^{52,53}; essa característica única dos miRNAs os tornam ferramentas eficientes para determinação de vias específicas envolvidas em doenças ou processos biológicos.

1.5 miRNAs e Miogênese

A modulação da expressão gênica por miRNAs surgiu como elemento de transcrição adicional para o controle da miogênese⁵⁴. A função dos miRNAs na regulação miogênica foi inicialmente descrita pela expressão dos miRNAs músculo-específico *miR-1*, *miR-133a* e *miR-206*⁵⁵⁻⁵⁷. Estudos subsequentes demonstraram que a superexpressão do *miR-1*, em células da linhagem HeLa, diminuía a regulação direta ou indireta de mais de 100 mRNAs, além de alterar o perfil de expressão global dessas células⁴⁷. Nos mioblastos da linhagem celular C2C12, os miRNAs *miR-1*, *miR-133a*, *miR-206*, *miR-214* e *miR-186* influenciam a diferenciação miogênica⁵⁸⁻⁶². Esses resultados mostram os miRNAs como importantes reguladores dos diferentes estágios da miogênese.

Os primeiros estudos com miRNAs e seus respectivos alvos baseavam-se, exclusivamente, em experimentos laboratoriais, de modo que os primeiros foram identificados por meio de técnicas de genética clássica⁶³. Diante disso, estudos de bioinformática surgiram da necessidade dos cientistas de desenvolver novas ferramentas e abordagens que pudessem facilitar e dinamizar o estudo dessas moléculas⁶⁴. Atualmente, análises computacionais são indispensáveis na identificação e compreensão do papel biológico desses RNAs, para a expansão de banco de dados, predição e validação de alvos⁶⁴⁻⁶⁶.

Através de algoritmos computacionais do *miRWalk database*⁶⁷, identificamos o RNA mensageiro da OGN como um alvo de regulação pós-transcricional pelo *miR-22*. Este miRNA foi primeiramente identificado na linhagem celular Hela e, posteriormente, demonstrado ser expresso em vários tecidos, atuando também na miogênese do tecido cardíaco, fator de supressão tumoral e oncogênico⁶⁸⁻⁷¹. Análises filogenéticas mostram que no decorrer do processo evolutivo a sequência de nucleotídeos do *miR-22* é altamente conservada nos vertebrados, o que indica a importância biológica neste grupo⁷¹. Além

disso, Chen *et al* mostraram que o *miR-22* é diferencialmente expresso em células C2C12 durante o processo de diferenciação de mioblastos⁷².

Portanto, a hipótese é que a OGN é regulada pós-transcricionalmente pelo *miR-22*, participando dos processos de migração, proliferação e diferenciação de células musculares esqueléticas durante a miogênese.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

1. Avaliar a possível regulação da OGN pelo *mir-22-3p* durante a miogênese “*in vitro*” em células do músculo esquelético.

2.2. Objetivos Específicos

1. Validar a interação entre o *mir-22-3p* e a OGN;
2. Avaliar o efeito da superexpressão do *mir-22-3p* na migração, proliferação e diferenciação celular;
3. Avaliar o efeito da superexpressão do *mir-22-3p* na expressão gênica e proteica da MyoD e Myog.

3. Material e Métodos

3.1 Cultura Celular

Foram utilizadas células da linhagem celular de mioblastos conhecida por C2C12, que é frequentemente utilizada para o estudo da miogênese *in vitro* da musculatura esquelética, pois esse tipo celular rapidamente se diferencia em miotubos contráteis, expressando fatores musculares específicos. Esta linhagem, obtida em 1977 por Yaffe e Saxel no Instituto de Ciências Weizmann, Israel, é o resultado da cultura celular de mioblastos da coxa de ratos C3H após sofrerem lesões por esmagamento⁷³. Essa linhagem celular é uma importante ferramenta para o estudo da Biologia Muscular, pois expressa importantes vias celulares e moleculares do músculo esquelético e, possui muitos dados disponíveis, incluindo dados de *microarrays*⁷⁴⁻⁷⁷. Células da linhagem C2C12 obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ) foram cultivadas em garrafas com meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Thermo Fisher, USA*) complementados com 10% soro fetal bovino (SFB – *Thermo Fisher, USA*) e 1% de antibiótico (*Penicillin-streptomycin solution stabilized – Thermo Fisher, USA*) até atingirem confluência de 80-90% (~48 horas). Posteriormente, foram tripsinizadas: metade das células foi transferida para outra garrafa para expansão; a outra metade, distribuída em placas de 6 poços, com aproximadamente 200.00 células/poço para a formação dos grupos de estudo.

3.1.1. Delineamento Experimental

Após atingirem 80-90% de confluência, parte das células foram coletadas para análise da expressão gênica da OGN, MRFs e *miR-22* nos mioblastos. As células restantes foram submetidas à diferenciação a partir da substituição do meio crescimento, pelo meio de diferenciação, sem SFB, contendo soro de cavalo (2%), L-glutamina e

penicilina/estreptomicina (1%) para as análises da expressão gênica da OGN, MRFs e do *miR-22* tempos de 24 horas (início da formação dos miotubos) e 120 horas (miotubos diferenciados) (**Figura 4**). Foram consideradas miotubos as células que apresentaram dois ou mais núcleos⁷⁸.



Figura 4. Delineamento experimental para análise da expressão gênica da OGN durante a miogênese. MC (meio de crescimento: DMEM + soro fetal bovino + antibiótico para meio de proliferação, MD (meio de diferenciação): DMEM + soro de cavalo + antibiótico para o meio de diferenciação de mioblastos em miotubos.

3.2. Transfecção Celular

Para a formação dos grupos de estudo, as células foram transfectadas com diferentes oligonucleotídeos sintéticos, formando dois grupos experimentais, controle e tratado (três réplicas biológicas independentes/grupo experimental). Para isso, formaram-se os Complexos I e II, seguindo as recomendações do fabricante (**Figura 5**).

- Complexo I: composto pela *Lipofectamine RNAiMAX* (Thermo Fisher, USA) diluída em *Opti-MEN® Reduced Serum Medium* (Thermo Fisher, USA).

- Complexo II: composto pelos oligonucleotídeos do *mimic miR-22* (Thermo Fisher, *mirVanaTM miRNA Mimic*, MC10203 cód: 4464066) e respectivo controle negativo (Thermo Fisher, *mirVanaTM miRNA Mimic Negative Control*, cód: 4464058), diluídos em *Opti-MEN[®] Reduced Serum Medium* (Thermo Fisher, USA).

Após o período de incubação de 5 minutos, o Complexo I foi misturado ao Complexo II e incubados a temperatura ambiente durante 20 minutos. Em seguida, 250 µL de solução final de transfecção foram adicionados em cada poço contendo mioblastos e miotubos em meio de crescimento. As células foram transfectadas por 6 horas⁷⁹. A transfecção foi realizada em mioblastos e miotubos após 24 e 120 horas de diferenciação.

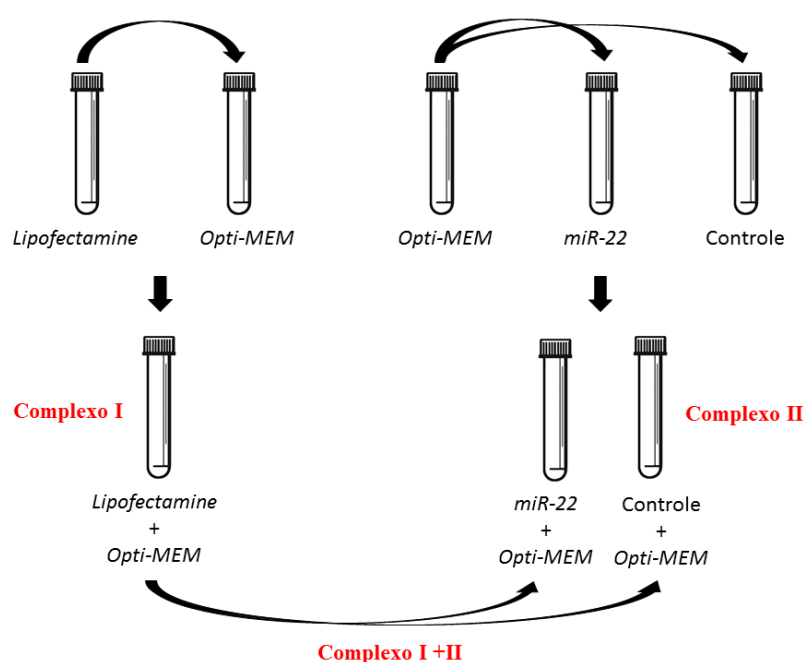


Figura 5. Esquema ilustrativo para formação dos Complexos para a transfecção. O Complexo I foi adicionado ao Complexo II, formando a solução final que foi utilizada para a transfecção em todos os experimentos.

3.3 RT-qPCR

A *RT-qPCR* foi realizada para analisar a expressão gênica da MyoD e da MYH2 (utilizados como marcador moleculares de proliferação e diferenciação, respectivamente), a expressão da OGN e do *miR-22* 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*⁸⁰.

3.3.1. Extração do RNA

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

3.3.2. Reação de Transcrição Reversa (cDNA para microRNA) e qPCR

A transcrição reversa dos microRNAs foi realizada utilizando o *kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (*Thermo Fisher, USA*) combinado com o *kit High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (*Thermo Fisher, USA*), seguindo as orientações do fabricante. Esse sistema permite a transcrição reversa apenas de microRNAs maduros. A mistura foi incubada nas seguintes condições: 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos. Informações sobre a sequência do ensaio (*Thermo Fisher, USA*) utilizado para análise do *miR-22* está descrito na **Tabela 1**. O gene endógeno snRNA U6 (*Thermo Fisher, USA*) foi utilizado como normalizador.

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos do *miR-22*

Assay	miRBase ID	Mature miRNA Sequence
hsa-miR-22	mmu-miR-22-3p	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU

miRBase: banco de dados de sequências de microRNAs. ID: identificação

3.3.3 Reação de Transcrição Reversa (cDNA para mRNA) e qPCR

A transcrição reversa do mRNA foi realizada utilizando o *kit High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Life Technologies, USA)*, seguindo as orientações do fabricante. Para a reação, foram utilizados 10 µl de *Master Mix* para a transcrição reversa de 2 µg de RNA, a qual foi completada com água livre de nucleases para um volume final de 20 µl. A mistura foi incubada nas seguintes condições: 25°C por 5 minutos, 42°C por 30 minutos e inativação da transcriptase reversa a 85°C por 5 minutos. Os primers para os genes analisados (**Tabela 2**) foram desenhados através da ferramenta *Primer Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), a partir de sequências publicadas no *GenBank*, e sintetizados pela empresa *Integrate DNA Technologies (Integrated DNA Technologies, Inc., USA)*. As reações para cada transcrito foram realizadas em duplicada técnica, no sistema *QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher, USA)*. As termociclagens foram padronizadas de acordo com as orientações do fabricante do equipamento. A quantificação relativa foi realizada através do método do ciclo de quantificação (Cq) comparativo e os valores obtidos foram normalizados pelos valores de expressão do gene constitutivo *Rpl13a*. Análises prévias do nosso laboratório identificaram o gene *Rpl13a* como altamente estável no modelo experimental utilizando as células da linhagem C2C12.

Tabela 2. Genes e sequência dos *primers* utilizados na RT-qPCR

Gene	Nome Oficial	NCBI REF Seq	Sequência dos <i>primers</i>
OGN	<i>Mus musculus</i> <i>Osteoglycin</i>	NM_008760.4	AATGATGAAATGCCCATGCC TTTGGCAATGGTGGTACAGC
MyoD1	<i>Mus musculus</i> <i>Myogenic differentiation1</i>	NM_010866.2	TCCTCATAGCACAGGGGTGA GCAAGCTGTGGGGAAAAGTG
Myog	<i>Mus musculus</i> <i>Myogenin</i>	NM_031189.2	CAGCCCAGCGAGGGAATTTA AGAAGCTCCTGAGTTTGCCC
RPL13a	<i>Mus musculus</i> <i>Ribosomal protein L13a</i>	NM_009438.5	AACGGACTCCTGGTGTGAAC TGGTCCCCACTTCCCTAGTT

NCBI REF Seq: Sequência de referência NCBI

3.4 Ensaio de Luciferase

3.4.1 Predição dos alvos do miR-22

A validação funcional do *miR-22* com a OGN foi iniciada a partir de análises de bioinformática, utilizando a ferramenta *TargetScan*⁸¹ (<http://www.targetscan.org/>), que identificou os possíveis sítios de ligação da OGN com o *miR-22* (**Figura 6A**).

3.4.2 Construção dos vetores pmirGLO-OGN 3'UTR-WT e -Mut

A construção do vetor repórter foi realizada a partir da síntese dos oligonucleotídeos (OGN 3'UTR-WT), e, em seguida, a região 3'UTR do gene da OGN resultante da amplificação foi purificada e inserida no vetor pmirGLO *Dual-Luciferase miRNA Vector* (Promega, USA), de acordo com as especificações do fabricante. Esses oligonucleotídeos possuem sequências complementares, e ao serem anelados, formam um segmento de DNA de fita dupla correspondente ao sítio de ligação do *miR-22* com a região 3'UTR da OGN. Formam-se, então, extremidades coesivas aos sítios de restrição das enzimas *XhoI* e *XbaI* (**Figura 6B**).

Da mesma forma, foi desenhado outro par de oligonucleotídeos (OGN 3'UTR-Mut), os quais possuem mutação *misense*, inviabilizando a ligação do *miR-22* com a região 3'UTR da OGN (**Figura 6B**).

TargetScan (OGN/mmu-miR-22-3p)
Position 470-77 OGN 3'UTR

A

DNA 5' ... **TGTACTTTCTGTCAA-GGCAGCTA** ... 3'

mRNA 5' ... UGUACUUUCUGUCAA-GGCAGCUA ... 3'

miR-22-3p 3' UGUCAAGAAGUUGACCGUCGAA

B

OGN-3' UTR-WT

-OGN-3' UTR-Forward-WT

TCGAGTAGCGGCCGCTAGTTGTACTTTCTGTCAAGGCAGCTAT

-OGN-3' UTR-Reverse-WT

CTAGATAGCTGCCTTGACAGAAAGTACAACCTAGCGGCCGCTAC

Forward 5' **XhoI** TCGAGTAGCGGCCGCTAGTTGTACTTTCTGTCAAGGCAGCTAT **XbaI** 3'

Reverse 3' CATCGCCGGCGATCAACATGAAAGACAGTTCCGTCGATAGATC 5'

Sítio de ligação do miR-22

OGN-3' UTR-Mut

-OGN-3' UTR-Forward-Mut

TCGAGTAGCGGCCGCTAGTTGTACTTAGAGTCAAGCGTCGTAT

-OGN-3' UTR-Reverse-Mut

CTAGATACGACGCTTGACTCTAAGTACAACCTAGCGGCCGCTAC

Forward 5' **XhoI** TCGAGTAGCGGCCGCTAGTTGTACTTAGAGTCAAGCGTCGTAT **XbaI** 3'

Reverse 3' CATCGCCGGCGATCAACATGAATCTCAGTTTCGAGCATAGATC 5'

Sítio de ligação do miR-22

* mutação *misense*

Figura 6. Construção dos plasmídeos pmiRGLO-OGN-3'UTR-WT e -Mut para ensaio do gene repórter. (A) Sítio predito de ligação do miR-22 na região 3'UTR da OGN, utilizando o algoritmo TargetScan. (B) OGN-3'UTR-Forward-WT e OGN-3'UTR-Reverse-WT: oligonucleotídeos contendo o sítio de ligação do miR-22 com a região 3'UTR da OGN. OGN-3'UTR-Forward-Mut e OGN-3'UTR-Reverse-Mut : oligonucleotídeos contendo mutações na região *seed* utilizado como controle. Oligonucleotídeos sintetizados utilizando as enzimas de restrição NotI, XbaI, XhoI.

3.4.3 Ensaio do gene *reporter* Luciferase

Para a validação da regulação pós-transcricional da OGN pelo *miR-22*, mioblastos C2C12 e fibroblastos NIH3T3 foram cultivados em placas de 12 poços da densidade de 5×10^4 células/poço. Após 24h do plaqueamento, as células foram transfectadas com 1 μ g do vetor repórter (pmirGLO-OGN-3'UTR-WT ou -Mut), na presença ou ausência de 30nM de *mimic* do *miR-22* (**Figura 7**). Após 6h da transfecção, as células foram lavadas com PBS 1x e lisadas com 1x *Passive Lysis Buffer* (Promega, USA). O lisado foi coletado e a atividade da luciferase, a partir da análise de luminescência, foi realizada com o *kit Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega, USA). A leitura do sinal de luminescência foi realizada em placa de 96 poços, em luminômetro *SpectraMax L* (Molecular Devices, USA). Os valores foram normalizados pelo nível de luminescência de *Renilla*, codificada no plasmídeo pmiRGLO, através de um ponto independente.

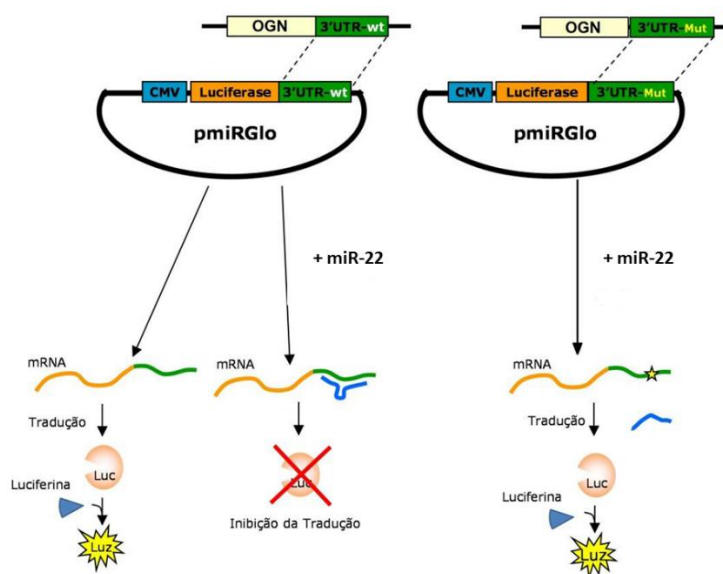


Figura 7. Ensaio de Gene Reporter Luciferase para a validação funcional de alvos de miRNAs. O segmento contendo o possível site de ligação do *miR-22* com a região 3'UTR da OGN foi clonado em um plasmídeo pmiRGLO, em fusão com o gene da luciferase, formando dois diferentes plasmídeos. **pmiRGLO-OGN-3'UTR-WT**: a ligação do *miR-22* diretamente à região 3'UTR de Ogn induz repressão pós-transcricional do mRNA da luciferase, que resulta em diminuição dos níveis de luminescência; **pmiRGLO-OGN-3'UTR-Mut**: controle, possuindo mutações que impedem a ligação de *miR-22* à 3'UTR de Ogn, restaurando os níveis de luminescência.

3.5 Ensaio de Migração – *Wound Healing*

O ensaio de *Wound Healing* foi realizado para a análise qualitativa *in vitro* da migração celular. Foi investigado o potencial migratório/proliferativo dos mioblastos após transfecção com o *mimic* do *miR-22*. As células foram cultivadas em placas de 6 poços numa concentração inicial de 200.000 células/poço, até atingirem 100% de confluência. As monocamadas foram lesadas (riscadas, mimetizando a criação de uma “ferida”) em linha reta no centro de cada poço com o uso de uma ponteira estéril de 200 µL. A área lesada foi estudada nos tempos 0h, 12h, 18h e 24h⁸² em microscópio invertido de contraste de fase e as imagens capturadas nos intervalos mencionados com a utilização de câmera digital acoplada. A velocidade de fechamento da “ferida” na placa de cultura foi calculada comparando a porcentagem da área da “ferida” no primeiro momento até o seu fechamento total, utilizando o programa *ImageJ*®.

3.6 *Western Blot*

3.6.1 Extração proteica

Para a expressão proteica, mioblastos e miotubos (de todos os grupos experimentais) foram cultivados em placas de 6 poços, e após o tratamento, lavados 2 vezes com PBS (*Phosphahte –buffered saline, Thermo Fisher, USA*), e em cada poço, foram adicionados 250 µL de tampão de lise RIPA (*Radio-Immunoprecipitation Assay, Sigma-Aldrich, USA*). Após 24h de incubação a -20°C os poços foram raspados para completa lise celular, o e o produto da homogeneização transferido para todos de 1.5 mL e centrifugado a 8000g por 10 minutos a 4°C. A concentração proteica total do sobrenadante foi analisada pelo método de *Bradford*⁸³ *Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, USA)*, utilizando curvas de *BSA Protein Standard (Bio-Rad Laboratories, USA)* como padrão.

3.6.2 Eletroforese e *Immunoblotting*

As amostras das proteínas foram diluídas em tampão *Laemmli* (*Sample Buffer Laemmli 2x Concentrate, Sigma-Aldrich, USA*) e separadas por eletroforese, utilizando o sistema *Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, USA)*. A corrida foi realizada em gel bifásico de empilhamento (Tris-HCL 240mM pH 6.8, poliacrilamida 30%, APS e Temed) e de resolução (Tris-HCL pH 8.8, poliacrilamida 30%, APS e Temed), na concentração de 10%. Foi utilizado *Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad, USA)* como padrão de peso molecular para identificação do tamanho das bandas. A corrida do gel foi efetuada a 120V (*Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, USA*), por aproximadamente 2 horas, com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192mM e SDS 1%). Em seguida, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema *Mini-Trans Blot (Bio-Rad, USA)*, utilizando tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 192mM, metanol 20% e SDS 0,1%). As membranas foram lavadas duas vezes com tampão TBS-T (Tris-HCL 20mM, NaCl 137 mM e Tween20 0,1%).

Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana 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. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com TBS-T e incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora, sob agitação constante *overnight*. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada 3x10 minutos e incubada com o anticorpo secundário por 2 horas sob agitação constante. Para eliminar o excesso de anticorpo secundário, as membranas foram lavadas 3x10 minutos com TBS-T. Por fim, a imuno-deteção foi realizada por meio do método de quimiluminescência *Enhancer Chemi-Luminescence (Amersham Biosciences, USA)*. As membranas de nitrocelulose foram expostas ao fotodocumentador *Image Quant™ 4000 (GE Healthcare, USA)* para visualização e

quantificação das bandas. Os anticorpos primários e secundários foram testados em diferentes concentrações, assim como todas as demais soluções e etapas metodológicas.

3.6.3 Anticorpos

- Osteoglicina (*Santa Cruz Biotechnology, USA*). Concentração 1:1000.
Peso molecular: 34 kDa.
- Myod (*Santa Cruz Biotechnology, USA*). Concentração 1:1000.
Peso molecular: 45 kDa.
- Myog (*Santa Cruz Biotechnology, USA*). Concentração 1:1000.
Peso molecular: 34 kDa.
- Gapdh (*Santa Cruz Biotechnology, USA*). Concentração 1:500.
Peso molecular: 37 kDa.

3.7 Imunofluorescência

A imunofluorescência das células C2C12 serviu para avaliar as possíveis alterações na diferenciação celular, visualizada pela medição da área dos miotubos formados, utilizando-se a marcação dos filamentos espesso do citoesqueleto com o anticorpo para miosina esquelética (MYH2). A imunofluorescência foi realizada utilizando-se o anticorpo monoclonal para a MYH2 (Sigma, código: M7523), de acordo com as orientações do fabricante. As células C2C12, cultivadas em placas de 6 poços, foram fixadas em paraformaldeído a 4% durante 10 min, lavadas com PBS, bloqueadas com 5% de soro bovino em PBS durante 1 h à temperatura ambiente, incubadas com anticorpos primário overnight a 4°C. Após essa incubação, as células passaram por 3 lavagens de 10 minutos com PBS, foram incubadas com anticorpo secundário durante 2h à temperatura ambiente e contrastadas com DAPI. Todas as imagens foram obtidas por

uma câmara (*ORCA - R2, Hamamatsu*) montada em um microscópio invertido (TE2000 - L, Nikon). As imagens capturadas foram utilizadas para análise e medição do diâmetro dos miotubos utilizando o programa *ImageJ*®.

3.8 Ensaio de Proliferação

A proliferação dos mioblastos foi analisada pelo ensaio MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue; Sigma-Aldrich, USA*). 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), 6, 12, 18 e 24 horas. O meio das células foi removido, lavado com PBS (*Phosphate-buffered saline, Thermo Fisher, USA*) 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, USA*) 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., UK)*. 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.

3.9 Análise estatística dos dados

Os valores de expressão gênica e proteica foram submetidos ao Test “t” de *Student* para amostras independentes. Os ensaios de migração e proliferação foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) para modelo de medidas repetidas em grupos independentes e complementados com o teste de *Bonferroni*. Todos os dados foram expressos em média±desvio padrão. O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5% ($\alpha=0,05$).

4 Resultados

4.1 Regulação pós-transcricional da osteoglicina pelo *miR-22*

Inicialmente, analisamos os níveis do *miR-22* e OGN nas fases de mioblastos e miotubos nos tempos de 24h e 120h, e observamos um padrão de expressão inversa durante as fases da miogênese (**Figura 8**).

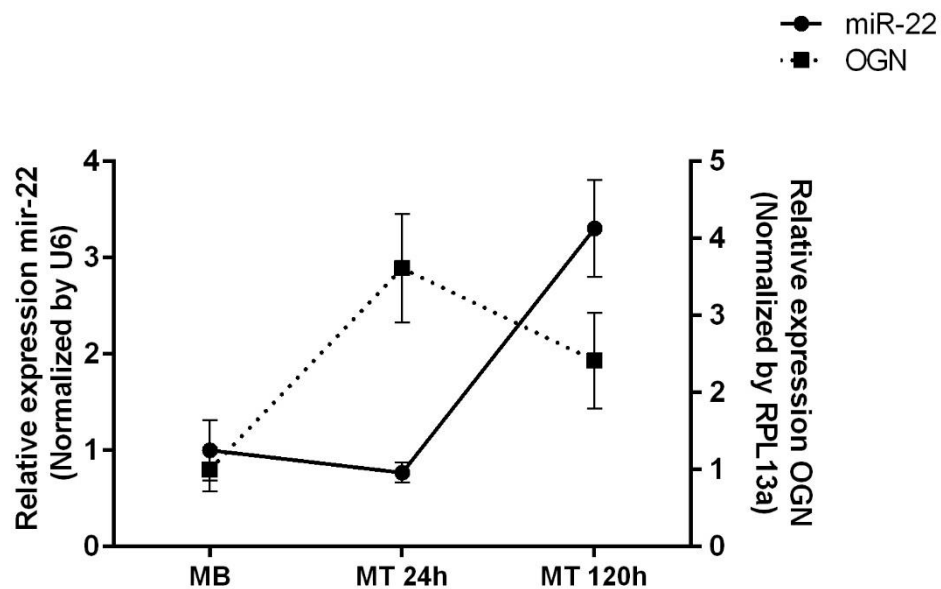


Figura 8. Expressão do *miR-22* e OGN nos mioblastos e miotubos sem o tratamento com o *mimic* do *miR-22*. MB: mioblastos; MT: miotubos.

Para testar a hipótese de que o *miR-22* é um candidato de regulação pós-transcricional da OGN, o Ensaio de Luciferase foi utilizado, a partir da clonagem de dois sítios de ligação, selvagem e mutado, para a região 3'UTR, utilizando o plasmídeo *lucifarese reporter*. Desta forma, foram gerados os plasmídeos *pmiRGlo-OGN-WT* (selvagem) e *pmiRGlo-OGN-Mut* (mutado). Fibroblastos da linhagem NIH3T3 também foram utilizados para o teste da hipótese.

A

mRNA 5' ...UGUACUUUCUGUCAAGGCAGCUA...3'

||||| |||||

miR-22-3p 3' UGUCAAGAAGUUGACCGUCGAA

B

miR-22 3' -UGUCAAGAAGUUGACCGUCGAA-5'

Mus musculus (Mouse) ...CUUUCUGUCAAGGCAGCUCUUC...

Homo Sapiens (Human) ...CCUCCUAUCAAGGCAGCUUUUU...

Pan troglodytes (Chimpanzee) ...CCUCCUAUCAAGGCAGCUUUUU...

Rhesus monkey (Monkey) ...CCUCCUAUCAAGGCAGCUUUUU...

Rattus norvegicus (Rat) ...CUUUCUGUCCAGGCAGCUUUUU...

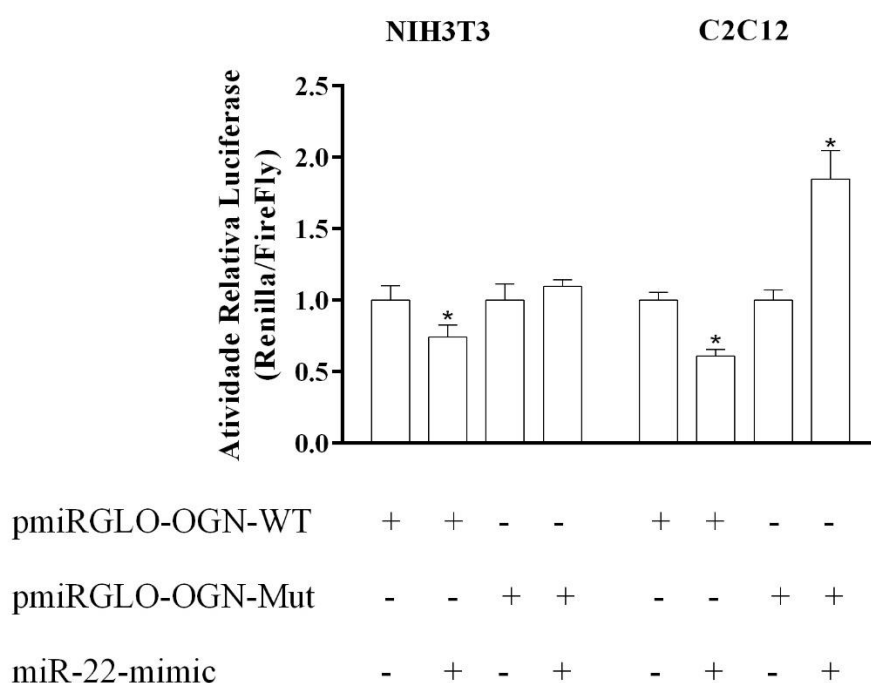
C

Figura 9. Identificação do sítio funcional de pareamento entre a OGN e o *miR-22*. (A) Representação esquemática do segmento da região 3'UTR da OGN com o sítio predito para interação com o *miR-22*. (B) Sequências “seed match” da região conservada 3'UTR da OGN em diferentes espécies. (C) Ensaio do gene repórter para ligação do *miR-22*, após transfecção dos plasmídeos contendo o sítio selvagem (pmiRGLO-OGN-WT) ou mutado (pmiRGLO-OGN-Mut), na presença (+) ou ausência (-) do mimic do *miR-22*. Valores da luciferase *firefly* normalizados pela luminescência da luciferase Renilla uma vez que pmiRGLO contém o gene codificador da luciferase de Renilla independente. *p<0,05 vs. pmiRGLO-OGN-WT.

4.2 Análise da transfecção em mioblastos e miotubos

Com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento do *mimic* do *miR-22* nos mioblastos e miotubos 24h, utilizamos a *RT-qPCR* para analisar os níveis intracelulares do *miR-22* após transfecção. Nossos resultados mostraram aumento da expressão do *miR-22* nas células C2C12 após o tratamento com *mimic* do *miR-22* (**Figura 10**).

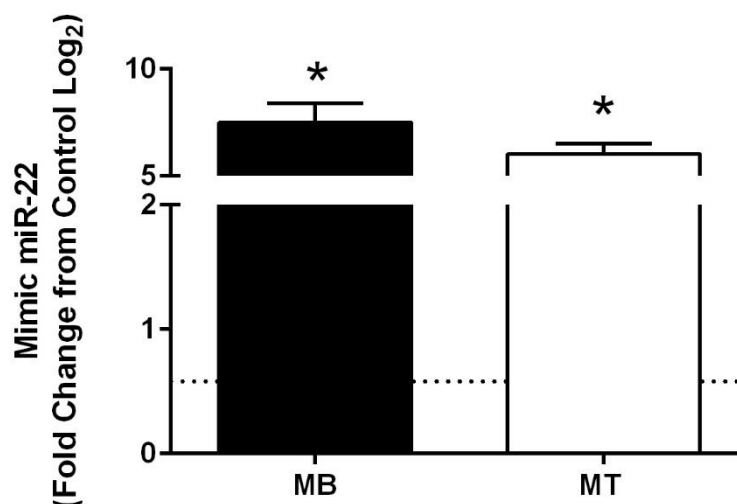


Figura 10. Expressão gênica do *mimic* do *miR-22* nos mioblastos e miotubos 24hs. Resultados apresentados em média $\pm$ desvio padrão. Diferença estatística analisada pelo teste “t” de Student. *p < 0,05 vs Control. MB: mioblastos; MT: miotubos 24hs.

4.3 Superexpressão do *miR-22* altera a expressão gênica da OGN em mioblastos

Após a comprovação do aumento do *miR-22* nas células C2C12 após tratamento com *mimic* do *miR-22*, mioblastos e miotubos foram coletados para a análise da expressão gênica da OGN e dos marcadores miogênicos MyoD e Myog.

Como resultados, encontramos uma diminuição dos níveis gênicos da OGN, enquanto que a Myog apresentou um aumento de expressão em mioblastos; não houve alteração nos níveis da MyoD (**Figura 11**). Houve aumento de expressão da MyoD em miotubos, entretanto, os níveis da OGN e Myog não apresentaram diferença significativa nos mioblastos diferenciados (**Figura 12**).

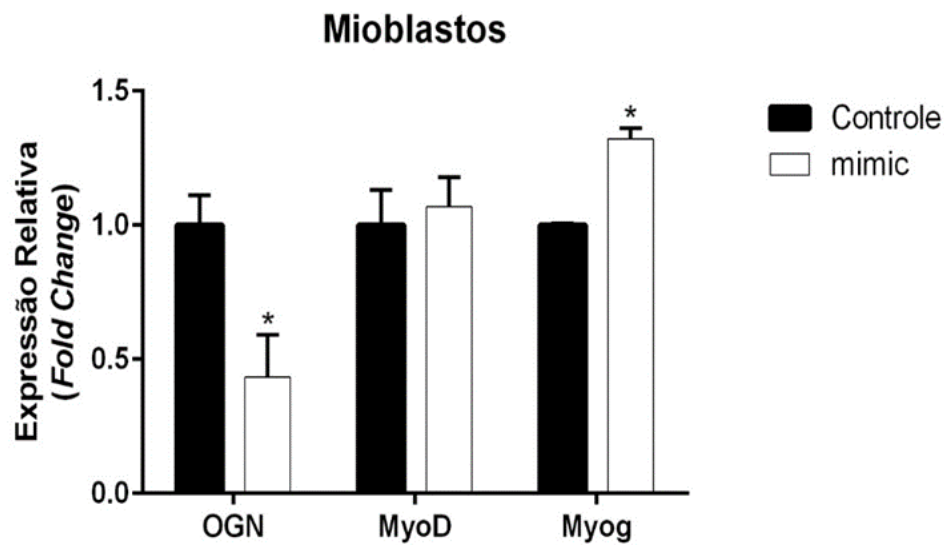


Figura 11. Expressão gênica da Ogn e dos marcadores moleculares da miogênese MyoD e Myog nos mioblastos tratados com *miR-22 mimic*. Resultados apresentados em média $\pm$ desvio padrão. Diferença estatística analisada pelo teste “t” de Student. *p < 0,05 vs Controle. OGN: Osteoglicina, Myog: Miogenina.

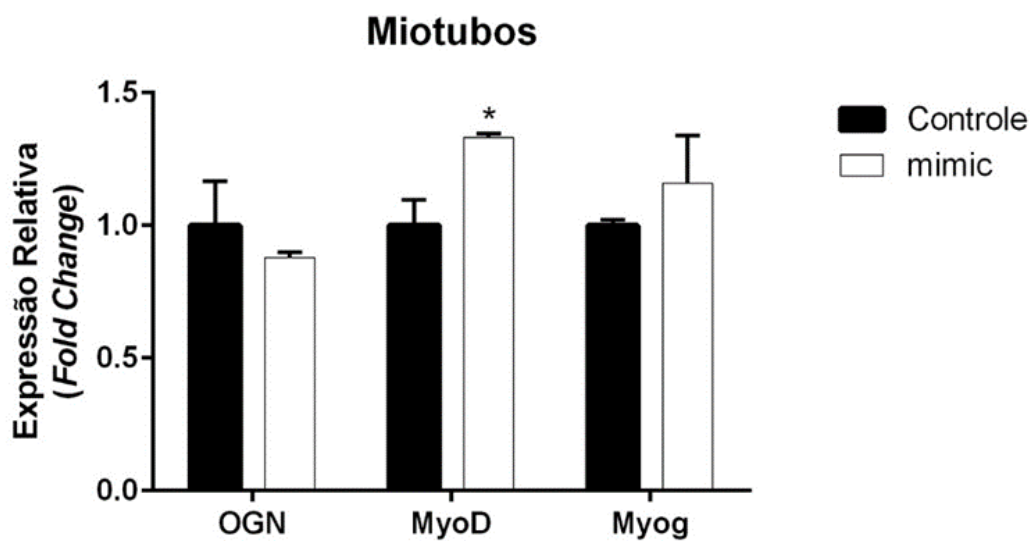


Figura 12. Expressão gênica da Ogn e dos marcadores moleculares da miogênese Myod e Myog, nos miotubos 24hs tratados com o *mimic* do *miR-22*. Resultados apresentados em média $\pm$ desvio padrão. Diferença estatística analisada pelo teste “t” de Student. *p < 0,05 vs Controle. OGN: Osteoglicina, Myog: Miogenina.

4.4 Superexpressão do *miR-22* altera a expressão proteica da OGN em mioblastos

Após a comprovação do aumento do *miR-22* nas células C2C12 após tratamento com *mimic* do *miR-22*, mioblastos e miotubos foram coletados para a análise da expressão proteica da OGN e dos marcadores miogênicos MyoD e Myog.

Como resultados, encontramos uma diminuição dos níveis proteicos da OGN nos mioblastos, enquanto que em miotubos não foi observada diferença significativa. A superexpressão do *miR-22* também não alterou a os níveis proteicos dos marcadores miogênicos MyoD e Myog, tanto em mioblastos, quanto em miotubos.

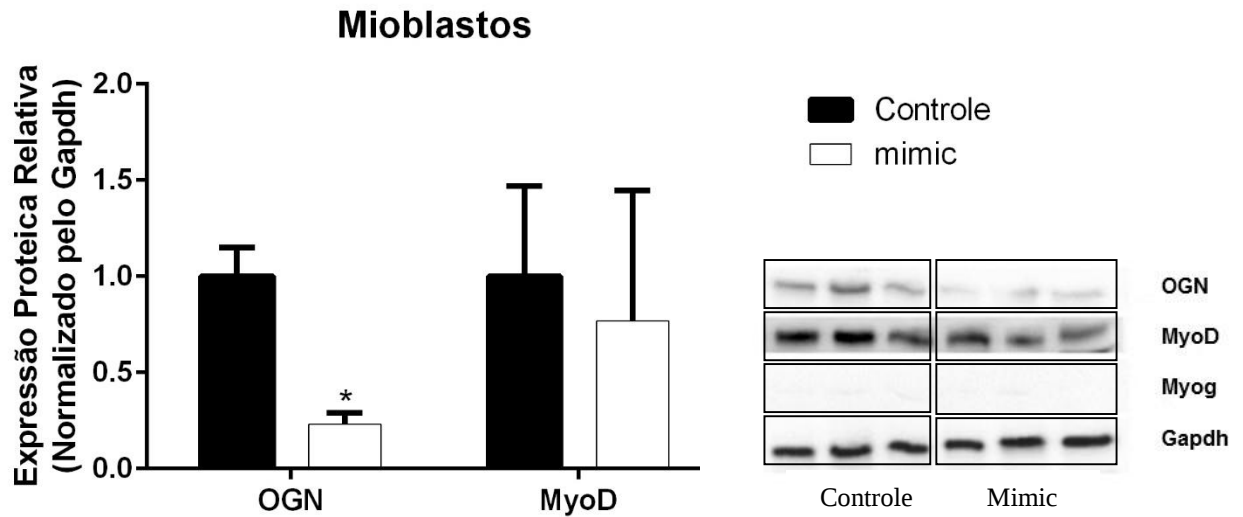


Figura 13. Expressão proteica da Ogn e dos marcadores moleculares da miogênese Myod e Myog, nos mioblastos tratados com o *mimic* do *miR-22*. Resultados apresentados em média $\pm$ desvio padrão. Diferença estatística analisada pelo teste “t” de Student. *p < 0,05 vs Controle. OGN: Osteoglicina, Myog: Miogenina.

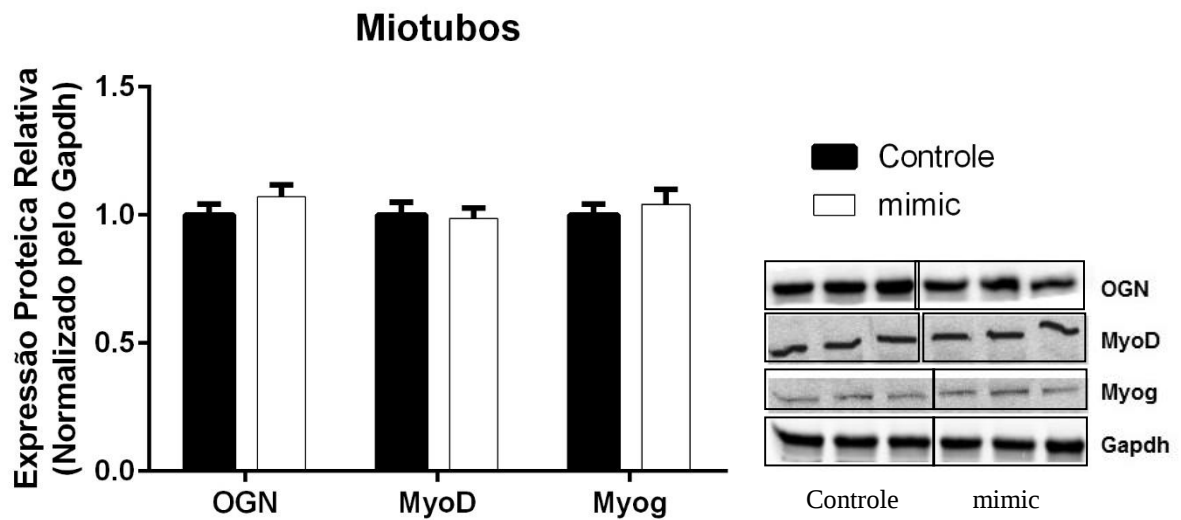


Figura 14. Expressão proteica da Ogn e dos marcadores moleculares da miogênese Myod e Myog, nos miotubos 24hs tratados com o *mimic* *miR-22*. Resultados apresentados em média $\pm$ desvio padrão. Diferença estatística analisada pelo teste “t” de Student. *p < 0,05 vs Controle. OGN: Osteoglicina, Myog: Miogenina

4.5 Superexpressão do *miR-22* não altera a formação dos miotubos

Para investigar a etapa final da miogênese, a imunofluorescência foi realizada para avaliar o processo de diferenciação dos miotubos 72hs, após realizada a transfecção do mimético do *miR-22*. Foram utilizados anticorpos para a OGN e Myh2 (marcador miogênico de diferenciação). A partir de uma análise qualitativa, as células transfectadas com o mimético do *miR-22* apresentaram menor expressão da OGN, entretanto, não houve alterações nos parâmetros utilizados para avaliar o efeito da superexpressão do *miR-22* na formação dos miotubos (**Figura 15**).

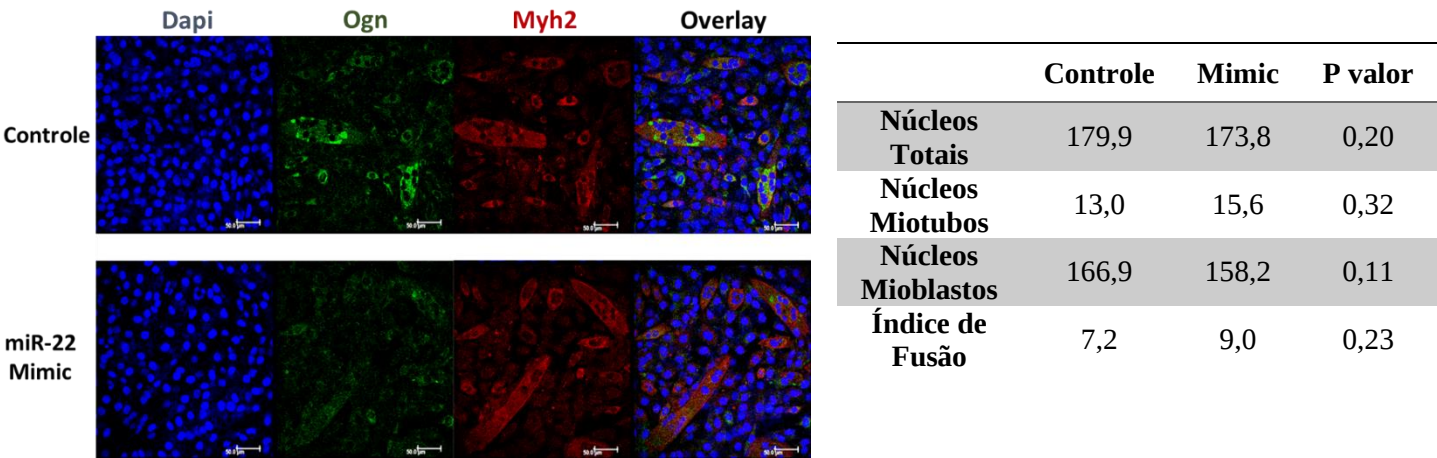


Figura 15 *miR-22* altera a expressão da OGN nos miotubos 72hs. Imunofluorescência das células C2C12 tratadas com mimético do *miR-22*. Células foram induzidas a diferenciação e marcadas com os anticorpos para Myh2 (vermelho) e Ogn (verde). Dapi foi utilizado para marcação dos núcleos. Resultados apresentados em média $\pm$ desvio padrão. Diferença estatística analisada pelo teste “t” de Student. *p <0,05 vs Controle. OGN: Osteoglicina, Myh2: miosina.

4.6 Superexpressão do *miR-22* aumenta a migração de mioblastos

O ensaio de *Wound Healing* foi utilizado para avaliar o efeito do *miR-22* na migração das células C2C12 em estágio de mioblasto após a transfecção das células com o *mimic* do *miR-22*, como descrito em Grzelkowska-Kowalczyk et al⁸⁴. As células C2C12 transfectadas com o *miR-22* aumentaram a taxa de migração após 18 horas e 24 horas (**Figura 16**). O ensaio de Wound Healing mostrou que o aumento da expressão do *miR-22* acelera o processo de migração das células C2C12.

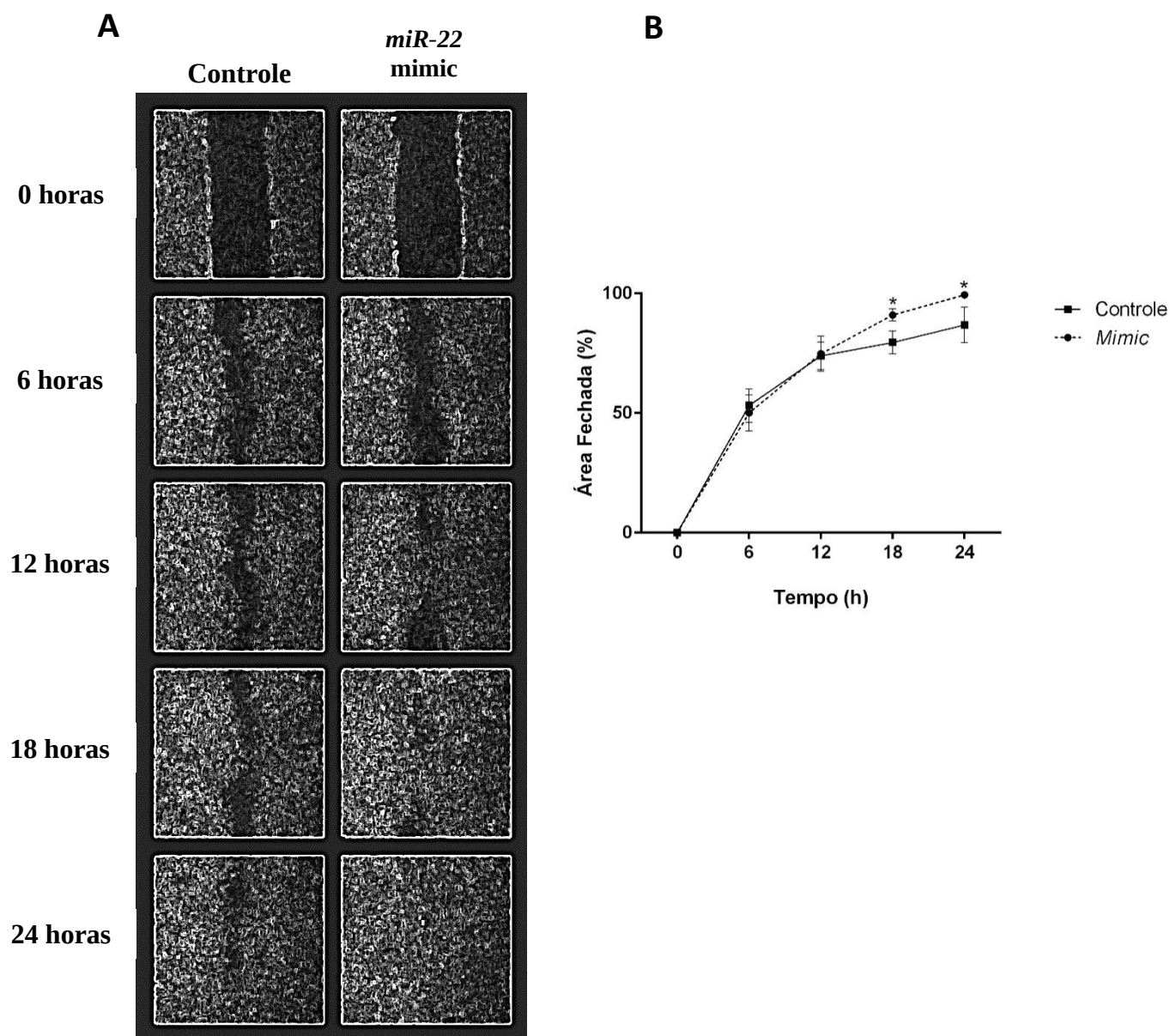


Figura 16. Análise da migração celular dos mioblastos pelo método de *Wound Healing*. (A) Fotos representativas do aumento da migração dos mioblastos transfectados com o *mimic* do miR-22, nos tempos de 0h, 6h, 12h, 18h e 24h. **(B)** Gráfico em porcentagem relativa (%) $\pm$ desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas e grupos independentes. * $p < 0,05$ vs Controle

4.7 miR-22 aumenta a proliferação de mioblastos

Para estudar os efeitos do *miR-22* no processo de proliferação dos mioblastos, o *mimic* do *miR-22* foi transfectado nas células C2C12. A proliferação foi mensurada pelo ensaio de MTT, como descrito por Mosmann⁸⁵. Após 24h, houve aumento na taxa de proliferação das células transfectadas com o *miR-22* comparadas aos mioblastos do grupo controle. Não houve diferença nos tempos de 6h, 12h e 18h após transfecção.

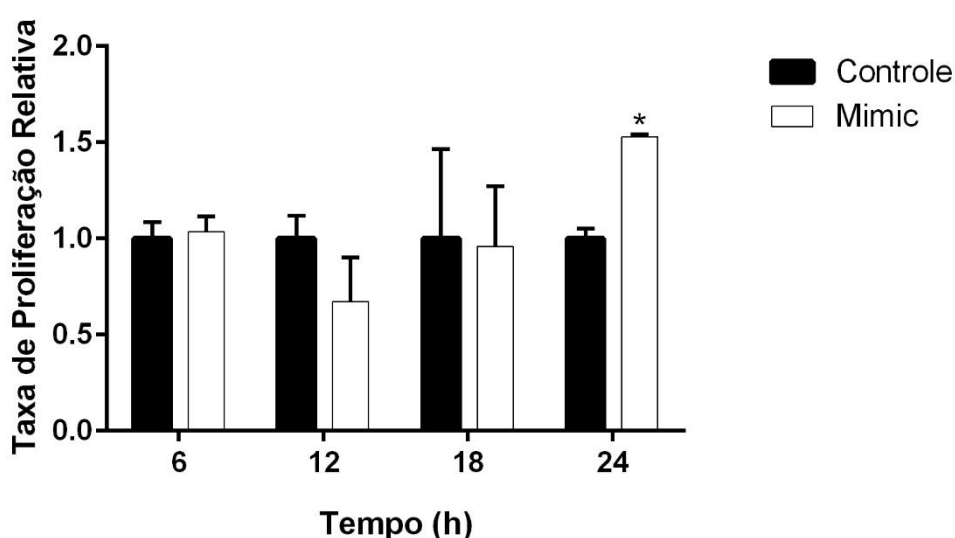


Figura 17. miR-22 e OGN aumentam a proliferação de mioblastos. Proliferação das células C2C12 analisadas pelo Ensaio de MTT após transfecção com o *mimic* do *miR-22*. A taxa de proliferação celular foi calculada através da variação entre a absorbância nos tempos 6, 12, 18 e 24 horas e absorbância inicial em relação à variação do tempo normalizado. Os dados foram quantificados e convertidos em taxa de proliferação por hora em relação ao controle para medidas repetidas e grupos independentes (ANOVA). * $p < 0,05$ vs Controle

5. Discussão

A hipótese do presente estudo é que a OGN possui regulação pós-transcricional pelo *miR-22* durante o processo de miogênese em células da linhagem esquelética C2C12. Para isso, realizamos o Ensaio de Luciferase nas células C2C12 e em fibroblastos NIH3T3 com o objetivo de validar essa relação. Observamos uma diminuição da atividade relativa da luciferase *firefly*, além da diminuição dos níveis de expressão gênica e proteica da OGN em mioblastos tratados com o *mimic* do *miR-22*. Os dados obtidos revelam uma nova via de regulação pós-transcricional entre o *miR-22* e a OGN durante o processo de miogênese em células musculares esqueléticas C2C12.

Para testar a hipótese de que a OGN é regulada pós-transcricionalmente pelo *miR-22*, e que este processo está associado com a miogênese, testamos a interação entre o *miR-22* e a região 3'UTR da OGN. Para a validação dos dados, o Ensaio de Luciferase foi utilizado, no qual a região 3'UTR da OGN foi clonada no plasmídeo pmiRGLO e co-transfectada com o *miR-22*. Como resultado, obtivemos uma diminuição dos níveis da luciferase *firefly*, comprovando a interação entre a região 3'UTR e o *miR-22*. Os nossos dados corroboram os achados da literatura que utilizam o gene *reporter* luciferase para a validação da interação direta entre miRNAs e mRNAs alvos⁸⁵.

O *miR-22* é uma molécula altamente conservada nas diferentes espécies, e dados da literatura mostram a sua atuação na regulação da expressão de genes envolvidos na hipertrofia e reorganização dos sarcômeros em cardiomiócitos, no processo de remodelação cardíaca^{70,86}. Entretanto, embora já existam dados de expressão global evidenciando a presença do *miR-22* em células musculares esqueléticas da linhagem C2C12 durante as fases de mioblasto e miotubo⁵⁸, são escassos os trabalhos que mostram as vias de regulação envolvendo este miRNA no músculo esquelético, mais especificamente, a interação entre o *miR-22* e a OGN. Para dar início a essa investigação,

realizamos a transfecção do *mimic* do *miR-22* para a análise dos efeitos da superexpressão do *miR-22* nas células C2C12 durante a miogênese, através do estudo da OGN e dos MRFs, MyoD e Myog. Não houve alteração na expressão da OGN nos miotubos, ao contrário do que ocorreu nos mioblastos, onde observamos uma diminuição nos níveis gênicos e proteicos da OGN nos momentos iniciais da miogênese. A OGN é um importante proteoglicano que participa da estruturação da matriz extracelular (MEC)¹⁶. Sabe-se que a MEC é um componente celular dinâmico que atua fornecendo suporte estrutural para os diferentes tecidos, além de possuir na sua constituição diversas moléculas, como por exemplo, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, componentes que modificam ou interagem com outras proteínas, além dos proteoglicanos, como a OGN. Trabalhos tem demonstrado a participação dos componentes da MEC em processos musculares como migração, diferenciação celular, contração e regeneração⁸⁷. Assim, no nosso experimento, a diminuição nos níveis da OGN nos mioblastos, possivelmente alterou a constituição/organização da matriz extracelular, influenciando o processo de miogênese. A não alteração na expressão da OGN nos miotubos pode estar relacionada a dois fatores: o tratamento dos miotubos com o *mimic* não foi capaz de alterar a homeostase das células, uma vez que os miotubos estudados já apresentavam altos níveis da OGN ou é possível que a transfecção não tenha sido eficiente nos miotubos. Novos experimentos envolvendo a transfecção do *mimic* do *miR-22* estão programados para o estudo da OGN em miotubos.

A avaliação da expressão dos MRFs (MyoD e Myog) mostrou aumento dos níveis de mRNA da MyoG em mioblastos e de MyoD em miotubos. A MyoG é um dos marcadores miogênicos que inicia o processo de diferenciação¹, e o aumento nos níveis de expressão nos mioblastos no nosso estudo, sugere que a diminuição na expressão da OGN promoveu a diferenciação precoce dos mioblastos alterando o processo de

miogênese, fato que pode explicar, em parte, os dados obtidos no ensaio de *Wound Healing* e no ensaio de proliferação pelo MTT, onde a taxa de migração dos mioblastos aumentou nos tempos de 18h e 24h. Com relação ao aumento dos níveis gênicos da MyoD nos miotubos, a superexpressão do *miR-22* pode ter prolongado o processo de proliferação celular nessa fase, embora, em condições normais esse marcador pode apresentar elevados níveis de expressão tanto nos mioblastos quanto em miotubos¹.

6. Conclusões

O *miR-22* regula pos-transcricionalmente a expressão da osteoglicina, controlando os processos de migração, proliferação e diferenciação de células musculares durante a miogênese.

7. Referências

1. Bentzinger, C. F., Wang, Y. X. & Rudnicki, M. a. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, (2012).
2. Salvatore, D., Simonides, W. S., Dentice, M., Zavacki, A. M. & Larsen, P. R. Thyroid hormones and skeletal muscle-new insights and potential implications. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 206–14 (2014).
3. Braun, T. & Gautel, M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 349–61 (2011).
4. Buckingham, M. & Rigby, P. W. J. Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis. *Dev. Cell* **28**, 225–38 (2014).
5. Massari, M. E. & Murre, C. MINIREVIEW Helix-Loop-Helix Proteins : Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms. **20**, 429–440 (2000).
6. Capers, C. R. Multinucleation of skeletal muscle in vitro. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**, 559–66 (1960).
7. Holtzer, H. DNA synthesis and myogenesis. *Exp. Cell Res.* **520**, 508–520 (1961).
8. Goulding, M., Lumsden, a & Paquette, a J. Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development* **120**, 957–71 (1994).
9. Williams, B. a & Ordahl, C. P. Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development* **120**, 785–96 (1994).
10. Amthor, H., Christ, B. & Patel, K. A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth - a balance between proliferation and differentiation. *Development* **126**, 1041–53 (1999).
11. Megeney, L. A. & Rudnicki, M. A. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol* **73**, 723–32 (1995).
12. Chargé, S. B. P. & Rudnicki, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* **84**, 209–38 (2004).
13. Bischoff, R. A satellite cell mitogen from crushed adult muscle. *Dev. Biol.* **115**, 140–147 (1986).
14. Bischoff, R. Interaction between satellite cells and skeletal muscle fibers. *Development* **109**, 943–952 (1990).
15. Pedersen, Bente K, F. M. A. Muscle as an Endocrine Organ : Focus on Muscle-

- Derived Interleukin-6. *Am. Physiol. Soc.* 1379–1406 (2008). doi:10.1152/physrev.90100.2007.
16. Chan, C. Y. X. *et al.* Identification of differentially regulated secretome components during skeletal myogenesis. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M110.004804 (2011).
 17. Tanaka, K. -i. *et al.* Role of Osteoglycin in the Linkage between Muscle and Bone. *J. Biol. Chem.* **287**, 11616–11628 (2012).
 18. Barrett, T. *et al.* NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res.* **41**, D991–D995 (2013).
 19. Bentz, H. *et al.* Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone. *J. Biol. Chem.* **264**, 20805–10 (1989).
 20. 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. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 6657–64 (2005).
 21. Funderburgh, J. L. *et al.* Mimecan, the 25-kDa corneal keratan sulfate proteoglycan, is a product of the gene producing osteoglycin. *J. Biol. Chem.* **272**, 28089–95 (1997).
 22. Tasheva, E. S., Pettenati, M., Von Kap-Her, C. & Conrad, G. W. Assignment of mimecan gene (OGN) to human chromosome band 9q22 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **88**, 326–7 (2000).
 23. Tasheva, E. S., Corpuz, L. M., Funderburgh, J. L. & Conrad, G. W. Differential splicing and alternative polyadenylation generate multiple mimecan mRNA transcripts. *J. Biol. Chem.* **272**, 32551–6 (1997).
 24. 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. *Biochim. Biophys. Acta* **1517**, 333–8 (2001).
 25. Tasheva, E. S. *et al.* Mimecan/osteoglycin-deficient mice have collagen fibril abnormalities. *Mol. Vis.* **8**, 407–415 (2002).
 26. Guller, I. & Russell, a P. MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function. *J. Physiol.* **588**, 4075–4087 (2010).
 27. Ambros, V. *et al.* A uniform system for microRNA annotation. 277–279 (2003). doi:10.1261/rna.2183803.One
 28. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**, 4051–60 (2004).

29. Cai, X., Hagedorn, C. H. & Cullen, B. R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **10**, 1957–66 (2004).
30. Kim, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 376–85 (2005).
31. Borchert, G. M., Lanier, W. & Davidson, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 1097–101 (2006).
32. Landthaler, M., Yalcin, A. & Tuschl, T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr. Biol.* **14**, 2162–7 (2004).
33. Gregory, R. I. *et al.* The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**, 235–40 (2004).
34. Han, J. *et al.* The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* **18**, 3016–27 (2004).
35. 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).
36. Zeng, Y. & Cullen, B. R. Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J. Biol. Chem.* **280**, 27595–603 (2005).
37. Han, J. *et al.* Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* **125**, 887–901 (2006).
38. Berezikov, E., Chung, W., Willis, J., Cuppen, E. & Lai, E. C. Mammalian mirtron genes. *Mol. Cell* **28**, 328–36 (2007).
39. 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).
40. Ruby, J. G., Jan, C. H. & Bartel, D. P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* **448**, 83–6 (2007).
41. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* **17**, 3011–6 (2003).
42. Bohnsack, M. T., Czaplinski, K. & Gorlich, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* **10**, 185–91 (2004).

43. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. & Kutay, U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**, 95–8 (2004).
44. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 126–39 (2009).
45. Schwarz, D. S. *et al.* Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199–208 (2003).
46. 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. *J. Biol. Chem.* **282**, 32773–9 (2007).
47. Lim, L. P. *et al.* Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**, 769–73 (2005).
48. Lee, Y. S. & Dutta, A. MicroRNAs in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **4**, 199–227 (2009).
49. Sen, G. L. & Blau, H. M. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell Biol.* **7**, 633–6 (2005).
50. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. & Diederichs, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* **11**, 228–34 (2009).
51. Doench, J. G. & Sharp, P. A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* **18**, 504–11 (2004).
52. Esau, C. *et al.* miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* **3**, 87–98 (2006).
53. Leung, A. K. L. & Sharp, P. a. microRNAs: a safeguard against turmoil? *Cell* **130**, 581–5 (2007).
54. Ge, Y. & Chen, J. MicroRNAs in skeletal myogenesis. *Cell Cycle* **10**, 441–448 (2011).
55. 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 Biol* **5**, (2004).
56. Sokol, N. S. & Ambros, V. Mesodermally expressed *Drosophila* microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. *Genes Dev.* **19**, 2343–54 (2005).
57. Lagos-quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A. & Tuschl, T. New microRNAs from mouse and human. *RNA* **9**, 175–179 (2003).

58. Chen, J. *et al.* The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* **38**, 228–33 (2006).
59. Kim, H. K., Lee, Y. S., Sivaprasad, U., Malhotra, A. & Dutta, A. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J. Cell Biol.* **174**, 677–87 (2006).
60. Wong, C. F. & Tellam, R. L. MicroRNA-26a targets the histone methyltransferase Enhancer of Zeste homolog 2 during myogenesis. *J. Biol. Chem.* **283**, 9836–43 (2008).
61. Grünhagen, J. & Ott, C.-E. On microRNA-214 suppressing osteogenic differentiation of C2C12 myoblast cells by targeting Osterix. *Bone* **57**, 325–7 (2013).
62. Antoniou, A., Mastroiannopoulos, N. P., Uney, J. B. & Phylactou, L. a. miR-186 inhibits muscle cell differentiation through myogenin regulation. *J. Biol. Chem.* **289**, 3923–35 (2014).
63. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–54 (1993).
64. Min, H. & Yoon, S. Got target?: computational methods for microRNA target prediction and their extension. *Exp. Mol. Med.* **42**, 233 (2010).
65. Bentwich, I. Prediction and validation of microRNAs and their targets. *FEBS Lett.* **579**, 5904–10 (2005).
66. Rajewsky, N. microRNA target predictions in animals. *Nat. Genet.* **38 Suppl**, S8–13 (2006).
67. Dweep, H., Sticht, C., Pandey, P. & Gretz, N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by ‘walking’ the genes of three genomes. *J. Biomed. Inform.* **44**, 839–47 (2011).
68. Xiong, J. Emerging roles of microRNA-22 in human disease and normal physiology. *Curr. Mol. Med.* **12**, 247–58 (2012).
69. Sibbesen, N. A. *et al.* Jak3 , STAT3 , and STAT5 inhibit expression of miR-22 , a novel tumor suppressor microRNA , in cutaneous T-Cell lymphoma. *Oncotarget* **6**, (2015).
70. Huang, Z.-P. & Wang, D.-Z. miR-22 in cardiac remodeling and disease. *Trends Cardiovasc. Med.* **24**, 267–72 (2014).
71. Xiong, J., Du, Q. & Liang, Z. Tumor-suppressive microRNA-22 inhibits the

- transcription of E-box-containing c-Myc target genes by silencing c-Myc binding protein. *Oncogene* **29**, 4980–4988 (2010).
72. Chen, J., Mandel, E. M., Thomson, J. M., Wu, Q. & Thomas, E. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* **38**, 228–233 (2006).
 73. YAFFE, D. & SAXEL, O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* **270**, 725–727 (1977).
 74. 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).
 75. 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).
 76. 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. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6533–45 (2005).
 77. Stevenson, E. J., Koncarevic, A., Giresi, P. G., Jackman, R. W. & Kandarian, S. C. Transcriptional profile of a myotube starvation model of atrophy. *J. Appl. Physiol.* **98**, 1396–406 (2005).
 78. Seok, H. Y. *et al.* miR-155 inhibits expression of the MEF2A protein to repress skeletal muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* **286**, 35339–46 (2011).
 79. Hudson, M. B. *et al.* miR-182 attenuates atrophy-related gene expression by targeting FoxO3 in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **307**, C314–9 (2014).
 80. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–22 (2009).
 81. 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).
 82. Gamell, C. *et al.* BMP2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires PI3-kinase and Cdc42 activity. *J. Cell Sci.* **121**, 3960–70 (2008).
 83. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
 84. Grzelkowska-Kowalczyk, K. *et al.* Transcriptional Regulation of Important

- Cellular Processes in Skeletal Myogenesis Through Interferon- γ . *J. Interf. Cytokine Res.* **35**, 140919140152003 (2014).
85. Goljanek-Whysall, K. *et al.* Regulation of multiple target genes by miR-1 and miR-206 is pivotal for C2C12 myoblast differentiation. *J. Cell Sci.* **125**, 3590–3600 (2012).
86. Huang, Z.-P. *et al.* MicroRNA-22 Regulates Cardiac Hypertrophy and Remodeling in Response to Stress. *Circ. Res.* **112**, 1234–1243 (2013).
87. Jessen, J. R. Recent advances in the study of zebra fi sh extracellular matrix proteins. *Dev. Biol.* **401**, 110–121 (2015).

8. Publicações

8.1 Artigos publicados

MORETTO F, SIBIO MT, LUVIZON A, OLIMPO R, OLIVEIRA M, ALVES CAB, NOGUEIRA C. Triiodothyronine (T3) induces HIF1A and TGFA expression in MCF7 cells by activating PI3K. Life Sciences, 2016 (doi:10.1016/j.lfs.2016.04.024)

FREIRE PP, ALVES CAB, DEUS AF, LIMA-LEOPOLDO AP, LEOPOLDO AS, SILVA DCT, TOMASI LC, CAMPOS DHS, PADOVANI CR, CICOGNA AC. Obesity does not Lead to Imbalance Between Myocardial Phospholamban Phosphorylation and Dephosphorylation. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2014. (doi:10.5935/abc.20140083)

BRUDER-NASCIMENTO T, CAMPOS DHS, ALVES CAB, ST S, CICOGNA AC, CORDELLINI S. Effects of chronic stress and high-fat diet on the metabolic and nutritional parameters in rats. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 2013. (57(8):642-9.)

BRUDER-NASCIMENTO T, CAMPOS DHS, ALVES CAB, CICOGNA AC, CORDELLINI S. A Possible Increase of Activity of Endothelial L-Arginine/Nitric Oxide Pathway in Aortas of Diet-Induced Obesity Rats. Endocrinology & Metabolic Syndrome, 2011. (doi:10.4172/2161-1017.S8-001)

LIMA-LEOPOLDO AP, SUGIZAKI MM, NASCIMENTO AF, LUVIZOTTO RAM, CASTARDELI E, ALVES CAB, BRUM PC, CICOGNA AC. Involvement of L-type calcium channel and serca2a in myocardial dysfunction induced by obesity. Journal of Cellular Physiology, 2011. (doi: 10.1002/jcp.22643)

8.2 Capítulo de Livro Publicado

DEUS AF, LIMA-LEOPOLDO AP, LEOPOLDO AS, ALVES CAB, MAZETO CFS, SILVA DCT, CAMPOS DHS, TOMASI LC, FREIRE PP, CICOGNA AC. Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA) e bomba de cálcio da membrana plasmática (PMCA). Sinalização de Cálcio: Bioquímica e Fisiologia Celulares. 1ed.: Sarvier, 2012.