



**IDENTIFICAÇÃO E AÇÃO DE RNAs TRANSPORTADOS POR
EXOSSOMOS NA ATROFIA DE MIOTUBOS POR TNF- α**

LEONARDO NAZARIO DE MORAES

BOTUCATU-SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

IDENTIFICAÇÃO E AÇÃO DE RNAs TRANSPORTADOS POR
EXOSSOMOS NA ATROFIA DE MIOTUBOS POR TNF- α

LEONARDO NAZARIO DE MORAES

ORIENTADOR: Dr ROBSON FRANCISCO CARVALHO

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Campus de Botucatu, UNEP,
para obtenção do título de Doutor no
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas (Genética).

BOTUCATU-SP

2018

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

Moraes, Leonardo Nazario de.

Identificação e ação de RNAs transportados por exossomos na atrofia de miotubos por TNF- α / Leonardo Nazario de Moraes.

- Botucatu, 2018

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

Orientador: Robson Francisco Carvalho

Capes: 20202008

1. MicroRNAs. 2. Exossomos. 3. Fenótipo. 4. Fibras Musculares Esqueléticas. Atrofia.

Palavras-chave: Atrofia; C2C12; Exossomos; Miotubos; miRNAs.

Agradecimentos

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

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

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

Ao meu amigo Carlos Alexandre Alves pela amizade e convívio, sempre me deu apoio e forçar para que eu pudesse conduzir meu doutorado.

Minha amiga e irmã Tassiana Gutierrez de Paula, que sempre foi tão presente na minha vida, me ajudando em momentos de dificuldade. Gaúcha você é única.

A Jéssica Bindo de Barros que foi fundamental na execução desse trabalho, me ajudou incontáveis vezes na execução dos experimentos e na discussão de protocolos. De fato, a finalização desse trabalho não seria possível sem sua ajuda. Além disso você é uma grande amiga.

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

Meus amigos Jason Javier Fernandez e Juarez Henrique Ferreira, obrigado por todo apoio, ajuda e discussões que foram tão úteis para execução deste trabalho, e pelos momentos de descontração, risos e também muita raiva (risos).

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

Paula Paccielli Freire, Sara Santiloni, Grasieli de Oliveira, Bruna Zanella, Jéssica Silvino, Bruno Fantinatti, Bruno Duran e Rafaela Nunes por serem a minha segunda família e por fazerem me sentir tão bem no laboratório. Obrigada pelos momentos de alegria compartilhados, pelo companheirismo, pelos agradáveis e inesquecíveis momentos de convivência.

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

Aos professores Dra. Rejane Grotto, Dr. Guilherme Valente e Dra Adriana Camargo por todo apoio e incentivo para desenvolvimento e conclusão do meu doutorado.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu pelo companheirismo e amizade: Fabiana Furtado, Flávia Hebler, Cristiane Nonato, Gabriela Boni Poli, Francielle Martins, Lucas Belo, Maércio e Regina.

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

A CAPES pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

RESUMO

Os exossomos constituem uma classe de pequenas vesículas extracelulares de aproximadamente 40-150 nm originadas pelo sistema endossomal. Essas vesículas são produzidas constitutivamente por praticamente todos os tipos celulares, e são responsáveis por transportar distintas classes de moléculas, em resposta a diferentes estímulos. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que em condições tais como AIDS, septicemia, diabetes, insuficiência cardíaca, doença pulmonar obstrutiva crônica, diabetes e câncer, contribui para a atrofia de fibras musculares esqueléticas. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi caracterizar os RNAs transportados por exossomos de miotubos C2C12 com atrofia induzida por TNF- α e avaliar a ação desses exossomos no fenótipo de mioblastos e miotubos C2C12. Exossomos liberados no meio de cultura de miotubos C2C12 tratados com TNF- α , e de seus respectivos controles, foram isolados por ultracentrifugação e analisados quanto ao seu conteúdo de RNA por RT-qPCR (microRNAs) e sequenciamento de nova geração (RNA total). Além disso, mioblastos e miotubos C2C12 foram tratados com esses mesmos exossomos para analisar a expressão de genes envolvidos com ciclo celular e a capacidade de migração/proliferação (mioblastos), bem como na atrofia celular (miotubos). Nossos resultados demonstraram que exossomos provenientes de miotubos são capazes de alterar os níveis de transcritos de genes envolvidos na proliferação, motilidade e diferenciação de mioblastos em miotubos. Verificamos também que os exossomos provenientes de miotubos tratados com TNF α reduzem a capacidade de migração/proliferação de mioblastos. Além disso, identificamos que o tratamento de miotubos com TNF- α enriquece, nos exossomos, seis miRNAs (mmu-mir-365-3p, -146a-5p, -30b-5p, -34c-3p, -214-3p e -484), e dois RNAs ribossomais mitocondriais (12S e 16S) envolvidos em processos do metabolismo e diferenciação celular. Concluímos que o tratamento de miotubos com TNF α altera RNAs específicos no exossomos, os quais são capazes de alterar a expressão gênica, migração/proliferação e diferenciação de células musculares.

ABSTRACT

Exosomes constitute a class of small extracellular vesicles of approximately 40-150 nm originated by the endosomal system. These vesicles are constitutively produced by virtually all cell types and are responsible for carrying distinct classes of molecules in response to different stimuli. TNF- α is a proinflammatory cytokine that in conditions such as AIDS, septicemia, diabetes, heart failure, chronic obstructive pulmonary disease, diabetes and cancer, contributes to atrophy of skeletal muscle fibers. In this sense, the objective of the present study was to evaluate the expression and action of RNAs transported by exosomes from C2C12 myotubes with TNF- α -induced atrophy in the phenotype of myoblasts and myotubes. Exosomes released in the culture medium from TNF- α treated C2C12 myotubes and from their respective controls were isolated by ultracentrifugation and analyzed for their RNA content by RT-qPCR (microRNAs) and new generation sequencing (total RNA). In addition, myoblasts and C2C12 myotubes were treated with these same exosomes to analyze the expression of genes involved in cell cycle and migration / proliferation capacity (myoblasts), as well as cell atrophy (myotubes). Our results demonstrated that exosomes from myotubes alter the expression genes involved in the proliferation, motility and differentiation of myoblasts into myotubes. We also verified that exosomes from TNF α -treated myotubes decreased migration / proliferation capacity of myoblasts. In addition, we identified that the treatment of myotubes with TNF- α enriches, in the exosomes, six miRNAs (mmu-mir-365-3p, -146a-5p, -30b-5p, -34c-3p, -214-3p and - 484), and two mitochondrial ribosomal RNAs (12S and 16S) involved in cell metabolism and differentiation processes. We conclude that treatment of myotubes with TNF α alters specific RNAs in the exosomes, which, in turn, alter gene expression, migration / proliferation and differentiation of muscle cells.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. Introdução	1
1.1. Atrofia do Músculo Esquelético	1
1.2. Caquexia	2
1.3. Vias Moleculares na Caquexia	2
1.4. Papel dos MicroRNAs na Regulação da Atrofia Muscular	5
1.5. Vesículas Extracelulares	6
1.6. Papel das microvesículas na comunicação Celular	7
1.7. Biogêneses de microvesículas e exossomos	8
1.8. MicroRNAs em Vesículas Extracelulares no Tecido Muscular	10
1.9. Hipótese	12
2. Objetivos	13
2.1. Objetivo Geral	13
2.2. Objetivos Específicos	13
3. Material e métodos	14
3.1 Cultura celular	14
3.2. Purificação de exossomos liberados em meio de cultivo	14
3.3. Microscopia eletrônica de transmissão	15
3.4. Quantificação dos exossomos	15
3.5. Marcação por PKH67	16
3.6. Exposição dos mioblastos e miotubos aos exossomos isolados	16
3.7. Ensaio de Migração/Proliferação – Wound Healing	17
3.8. Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR)	17
3.9. Sequenciamento de RNA total em larga escala(RNA-Seq)	18
3.10. Reanálise de dados de expressão gênica global por microarrays	19
3.11. Predição de alvos de miRNAs	20
3.12. Análise estatística dos dados	20
4. Resultados	21
4.1. Tratamento com TNF- α induz atrofia de miotubos C2C12	21
4.2. Quantificação e caracterização dos exossomos	21

4.3. Exossomos isolados são viáveis e capazes de serem capturados pelas células receptoras	24
4.4. Exossomos alteram expressão gênica de mioblastos e miotubos	26
4.5. Exossomos alteram a migração celular	27
4.6. Exossomos proveniente de miotubos tratados com TNF- α transportam RNAs	28
4.7. mRNAs diferencialmente expressos em miotubos tratados com TNF- α	33
4.8. Interações miRNAs e RNAs mensageiros	34
5. Discussão	36
6. Conclusão	43
7. Referências Bibliográficas	44
8. Material Suplementar	58

1. Introdução

1.1. Atrofia do Músculo Esquelético

O músculo esquelético compõe cerca de 40 a 50 por cento da massa corpórea humana sendo constituído por células alongadas, multinucleadas (com núcleos periféricos) denominadas fibras musculares¹. Além do seu papel notório na atividade locomotora e postural, exerce um importante papel como regulador do metabolismo, atuando diretamente sobre o fígado e o tecido adiposo². O músculo estriado esquelético possui uma elevada capacidade adaptativa em resposta a diferentes condições e estímulos³. Por exemplo, exercício físico resistido age no músculo estimulando a síntese de proteínas sarcoméricas, que resulta em hipertrofia das fibra musculares e aumento da força muscular^{4,5}.

Por outro lado, condições de atrofia, como por exemplo, imobilização, repouso prolongado, desnervação, microgravidade, envelhecimento e doenças crônicas, conduzem o músculo para um processo de perda de volume, com a diminuição na quantidade de proteínas (principalmente proteínas sarcoméricas) das fibras musculares, com consequente perda de força e de resistência à fadiga⁶⁻⁹. A perda exacerbada da massa muscular evidenciada em diferentes tipos de doenças crônicas pode resultar num quadro caquético, que inclusive, está correlacionado com um pior prognóstico^{10,11}.

Estudos tem demonstrado que a atrofia muscular esquelética é conduzida pela ação coordenada de vias moleculares que envolvem IGF1-AKT-FoxO, miostatina, citocinas inflamatórias e o fator transcricional NF-kappa B (NF-kB)^{6,12} [para revisão, ver Braun & Gautel 2011¹³]. Durante a atrofia, os sistemas proteolíticos, com proteínas lisossomais (catepsinas), as calpaínas dependentes de cálcio e o proteassoma dependente de ubiquitina (PDU) atuam na degradação de proteínas musculares^{7,8,14}. Estudos em pacientes e em animais têm demonstrado consistentemente que o sistema proteossomal dependente de ubiquitina é um regulador primário da degradação proteica que leva a atrofia muscular^{7,12,13,15}. O aumento da expressão de pelo menos uma das 3 enzimas ligases de ubiquitina músculo-específicas MURF1 (*Muscle RING Finger protein 1*), MAFbx (*Muscle Atrophy F-box* ou atrogina-1)^{16,17} e E3IIα – é suficiente para induzir a degradação de proteínas miofibrilares em diferentes condições atroficas^{7,12,18}.

1.2. Caquexia

A caquexia é um fenômeno comum em várias doenças sistêmicas crônicas tais como septicemia, insuficiência cardíaca crônica, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença renal crônica, diabetes, AIDS e câncer¹⁹⁻²¹. Essas doenças podem ser acompanhadas de uma síndrome metabólica complexa caracterizada pela diminuição de massa muscular, com ou sem diminuição de massa gorda, denominada de caquexia^{19,20,22,23}. A característica clínica mais proeminente da caquexia é a perda de peso em adultos (corrigida pela retenção de líquidos) ou distúrbio de crescimento em crianças (excluindo desordens endócrinas)^{22,23}. A caquexia emerge a partir de alterações metabólicas do organismo, geralmente causadas por doenças crônicas que resultam na perda de apetite, baixos níveis de hormônios anabólicos e anemia^{22,24}. Essas alterações, por sua vez, resultam em perda de massa muscular, levando a uma condição de astenia, imobilidade e insuficiência respiratória ou cardíaca¹⁹. Por exemplo, a caquexia associada ao câncer diminui a resposta ao tratamento de rádio e quimioterápicos²¹. Aproximadamente 50% dos pacientes com câncer sofrem de caquexia e, notavelmente, aproximadamente 30% da mortalidade relacionada ao câncer são decorrentes da caquexia^{23,25}. Da mesma forma, pacientes com caquexia associada à insuficiência cardíaca também possuem uma menor expectativa de vida²⁶.

1.3. Vias Moleculares na Caquexia

As vias moleculares responsáveis pela caquexia não estão completamente esclarecidas, entretanto, evidências sugerem que citocinas pró-inflamatórias tais como interleucina (IL)-1 β , IL-6, interferon (INF)- γ e o fator de necrose tumoral (TNF)- α possuem um papel fundamental, principalmente no desenvolvimento de alterações celulares e moleculares que resultam na perda de função e massa muscular²⁷. Citocinas inflamatórias tais como TNF- α e IL-1 β inibem a diferenciação do músculo esquelético *in vitro*²⁸⁻³⁰; induzem a degradação de proteínas musculares específicas em miotubos diferenciados³¹⁻³⁴; altos níveis dessas citocinas também estão associados às alterações na matriz extracelular, impedindo a regeneração de fibras e inibindo a diferenciação de células musculares progenitoras em miofibras^{16,35} e, mais notavelmente ainda, os níveis elevados de TNF- α tem sido observados em condições que induzem a atrofia muscular tais como AIDS, septicemia, diabetes, insuficiência cardíaca, doença pulmonar obstrutiva crônica, e câncer³⁶⁻⁴¹.

O TNF- α exerce importantes propriedades pró-inflamatórias, que desempenham papéis cruciais na imunidade inata e adaptativa, proliferação celular e apoptose ⁴². Essa citocina é produzida por diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos, monócitos, células T, células musculares, adipócitos e fibroblastos ⁴³. Um dos mecanismos de ação dessa citocina inicia-se com a ligação do TNF- α a seus receptores, com subsequente ativação do fator nuclear *Kappa* B (NF- κ B), uma família de cinco fatores transcricionais [p65 (Rel A), Rel B, c-Rel, p52 e p50] envolvidos em vários processos celulares no músculo esquelético, tais como apoptose, imunidade, inflamação e desenvolvimento/diferenciação (para uma revisão, ver Peterson *et al.*, 2011 ⁴⁴). O heterodímero NF- κ B encontra-se normalmente inativo no citoplasma associado com a proteína I κ B ^{44,45}. O TNF- α , ao se ligar ao seu receptor de membrana, desencadeia a fosforilação da I κ B pelo complexo quinase I κ B (IKK); o I κ B por sua vez é ubiquitinizado (marcado) para posterior degradação pelo sistema Proteossomal Dependente de Ubiquitina (PDU) ⁴⁶. A degradação da I κ B permite que o NF- κ B se torne ativo e seja translocado para o núcleo da célula ⁴⁷ (**Figura 1**).

Os genes alvos do NF- κ B que são responsáveis pela atrofia da musculatura esquelética induzida pelo TNF- α ainda são pouco conhecidos. No entanto, a atrofia muscular induzida por essa citocinas parece resultar principalmente da proteólise específica de cadeia pesada de miosinas (MyHC), mediada pela ativação do sistema PDU pelo NF- κ B ¹⁶, que resulta no aumento da expressão de importantes enzimas como as ligases de ubiquitina E3 MuRF1 (Muscle RING Finger protein 1) ¹⁶ e MAFbx (Muscle Atrophy F-box ou atrogina-1)¹⁶.

Além disso, o aumento da expressão do NF- κ B induzido pelo TNF- α diminui a expressão de RNA mensageiro para a proteína Myod, um importante fator transcricional para a síntese de miosinas de cadeia pesada (MyHC)^{16,48}. A Myod é um fator transcricional músculo-específico pertencente à família “basic helix-loop-helix” (bHLH), bem como a Miogenina, Myf5 e o MFR4. Esses fatores transcricionais formam dímeros com proteínas E (ex. E12 ou E47), resultando em complexos que se ligam às sequências de DNA Ebox (5'-CANNTG-3') que estão presentes na região promotora de vários genes específicos, o que leva à expressão dos mesmos⁴⁹.

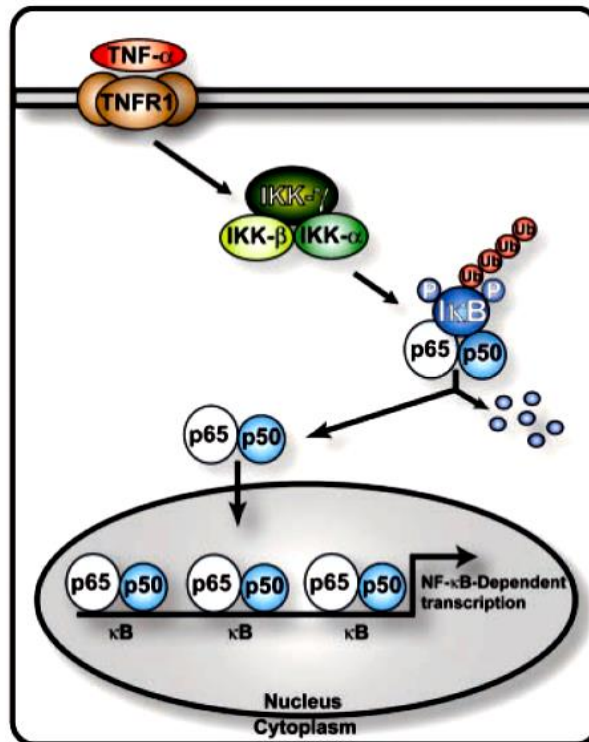


Figura 1. Esquema da atrofia muscular via NF- κ B induzida pelo TNF- α . A ligação do TNF- α ao seu receptor (TNFR1) induz a fosforilação da proteína I κ B pelo complexo quinase I κ B (IKK= IKK- γ + IKK- β + IKK- α) e a sua ubiquitinação (Ub) para a degradação proteossomal. O heterodímero NF- κ B (p65 + p50) é translocado para o interior do núcleo celular para a ativação de genes dependente de NF- κ B, relacionados com a atrofia muscular (adaptado de [Jackman & Kandarian, 2004]⁸).

Embora a diminuição do mRNA para Myod e diminuição da síntese de MyHC induzida pelo TNF- α já estejam bem caracterizadas, ainda é necessário elucidar os mecanismos globais de controle da expressão gênica responsáveis pelas alterações moleculares na atrofia muscular induzida por essa citocina. A complexidade dos mecanismos de controle da expressão gênica nesse processo sugere o envolvimento de moléculas reguladoras adicionais, como os microRNAs (miRNAs); essas moléculas de RNA codificadas pelo genoma atuam regulando vias no músculo esquelético durante o desenvolvimento e estão envolvidas em diversas doenças ou condições que induzem atrofia muscular, as quais tendem a evoluir para caquexia ⁵⁰.

1.4. Papel dos MicroRNAs na Regulação da Atrofia Muscular

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs reguladores não codificantes com tamanho variando de 17 a 25 nucleotídeos (ver miRBase, <http://www.mirbase.org/>), atuam reprimindo pós-transcricionalmente a tradução pelo reconhecimento de pontos complementares na região 3' não traduzida (3' UTR) de seus RNAs mensageiros alvos⁵¹. Em mamíferos, é predito que 60% de todos os genes codificadores de proteínas sejam regulados por miRNAs⁵² e, em alguns casos bem raros podendo ativar a tradução⁵³.

Diversos miRNAs são especificamente ou altamente expressos no músculo cardíaco e/ou esquelético. Por exemplo, 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 musculares⁵⁴⁻⁶⁰. Alguns desses miRNAs (miR-1, -133, -206 e -208) são regulados por redes transcricionais envolvendo SRF, Myod, Twist, MEF2 e miocardina^{61,62}. Os miRNAs miR-208a, -208b e -499 estão codificados no interior de íntron dos genes de cadeia pesada de miosina, respectivamente os genes Myh6 (α -MyHC), Myh7 (β -MyHC) e Myh-7b. Com base nisso, Van Rooij *et al.*,⁶¹ propuseram a existência de uma rede composta por esses três miRNAs, denominada de *MyomiR*, codificada pelos genes da miosina, que está envolvida da regulação da expressão de MyHC e, potencialmente nos tipos de fibras musculares. Interessantemente, alguns miRNAs não músculo-específicos também tem papel regulador na diferenciação muscular^{56,63} e também na regeneração após injúria^{56,64}.

Vários estudos indicam que a expressão de miRNAs está alterada em doenças que acomete músculo esquelético e, em alguns casos, um único miRNA pode ser a causa da doença^{65,66}. O miR-206, um importante miRNA para o músculo esquelético, encontra-se elevado no músculo diafragma do camundongo mdx (também conhecido como Dmd), modelo animal de distrofia muscular⁵⁹. De maneira semelhante, foi demonstrado que o miR-499 também está aumentado em modelo de atrofia muscular, sugerindo a ativação da rede MyomiR em modelos de atrofia⁶⁷. Por outro lado, os níveis de expressão do miR-1 e do miR-133a estão diminuídos em modelo de hipertrofia do músculo⁶⁵.

Soares *et al.*,⁶⁸ avaliaram o perfil de expressão de miRNAs no músculo esquelético de diferentes modelos de atrofia muscular, incluindo desnutrição, desnervação, diabetes induzida por estreptozotocina e caquexia associada ao câncer. Esses autores encontraram uma assinatura comum de expressão de miRNAs em diferentes condições atroficas e um conjunto específico

de miRNAs associado a cada uma dessas condições. Dentre esses miRNAs, o miR-206 e miR-21 foram identificados como importantes moduladores do processo de atrofia, controlando componentes críticos da função mitocondrial e síntese proteica.

Apesar da extrema importância dos miRNAs no próprio tecido que o gerou, novos estudos também têm demonstrado que muitos dos miRNAs expressos no músculo podem ter seus efeitos em outros tecidos e, inclusive, miRNAs gerados em outros tecidos, como por exemplo o fígado, podem ser transportados para o músculo esquelético². É aceito que muitos desses miRNAs são transportados e entregue a outros tecidos por meio de vesículas extracelulares⁶⁹.

1.5. Vesículas Extracelulares

Além da ação intracelular dos miRNAs, novos trabalhos têm demonstrado que essas moléculas podem ser sintetizadas por células musculares, transportadas por meio de vesículas extracelulares, e terem sua ação em diferentes tipos celulares, caracterizando um novo mecanismo de comunicação (“*cross-talk*”) celular^{70,71}.

Vesículas extracelulares (VEs) são definidas como vesículas intactas, com aproximadamente 0,1 a 2,0 µm de diâmetro, delimitadas por bicamada lipídica rica em fosfolipídios, as quais são secretadas a partir da membrana de diferentes tipos celulares após ativação por fatores de crescimento, citocinas e/ou durante a apoptose⁷². É aceito atualmente que praticamente todos os tipos celulares liberam vesículas extracelulares de maneira constitutiva e/ou após ativação⁷³. Além do termo microvesículas, inúmeros outros nomes já foram atribuídos às vesículas extracelulares, tais como micropartículas, ectossomos e vesículas derivadas da membrana plasmática⁷⁴.

Atualmente, as vesículas extracelulares têm sido classificadas com base em sua biogênese em: corpos apoptóticos, microvesículas (MVs) e exossomos⁷³. Os corpos apoptóticos são originados a partir da fragmentação de células em apoptose que variam entre 50 e 5000 nm, e podem conter DNA e histonas⁷³. As microvesículas são caracterizadas por serem liberadas da membrana plasmática através de brotamento externo e, geralmente, são mais heterogêneas em relação ao tamanho (50-2000 nm)⁷³. Os exossomos são definidos como sendo proveniente de endossomos multivesiculares (corpos multivesiculares) formados pelo sistema endossomal, e liberados para o meio exterior da célula pela fusão com a membrana plasmática; os exossomos variam entre 40 e 150 nm de tamanho, com densidade de flutuação de 1,13-1,19 g/cm³, e podem

ser identificados pelos marcadores ALG-2 e pelas tetraspaninas CD9 , CD63 , CD81 , CD82 e CD151 ^{75,76}. A liberação de vesículas extracelulares pode exercer diferentes funções biológicas, que inclui a eliminação de resíduos desnecessário ou nocivos à célula ou, em um contexto ainda mais relevante, essas vesículas podem atuar como um importante mecanismo de transporte de moléculas sinalizadoras e reguladoras que, de forma seletiva, influenciam o fenótipo e as funções de células receptoras ^{73,77}.

Apesar de existir um consenso para classificação das vesículas extracelulares, muitos dos primeiros trabalhos utilizam a mesma nomenclatura para denominar diferentes tipos de vesículas extracelulares. Inclusive, em alguns casos, vesículas com tamanho de exossomos, porém provenientes do brotamento citoplasmático foram denominadas de exossomos ⁷⁸. Sendo assim, para evitar confusões, no presente trabalho, denominaremos de exossomos as vesículas extracelulares que se originam exclusivamente de endossomos multivesiculares (como revisado em Raposo 2013 ⁷⁹).

1.6. Papel das microvesículas na comunicação Celular

A comunicação célula-célula é fundamental para uma boa coordenação entre diferentes tipos celulares dentro de um mesmo tecido ou tecidos/órgãos diferentes ⁸⁰. Essa comunicação pode ocorrer por diferentes mecanismos, incluindo fatores solúveis e insolúveis ⁸¹, de adesão mediada por moléculas de interações célula-célula, citonemas, ou nano-túbulos encapsulados, sendo que esses dois últimos permitem que as células se comuniquem não apenas por meio de moléculas de superfície, mas também por componentes citoplasmáticos ^{82,83}. Além desses mecanismos, as células podem se comunicar por meio de vesículas extracelulares que, além do seu papel notório na eliminação de macromoléculas, exercem papel fundamental na comunicação intercelular de forma seletiva ⁸⁰. Tal processo permite que a célula receptora adquira propriedades funcionais da célula emissora por meio de proteínas e/ou lipídeos bioativos ^{84,85}. Além disso, VEs podem transportar e contribuir com a disseminação de agentes infecciosos tais como o vírus ou *prions* ^{86,87}.

Outro fator preponderante na sinalização por VEs é o alcance que elas podem ter no organismo; uma vez secretadas, elas podem permanecer no espaço extracelular próximas às células de origem, ou serem transportadas ao longo do organismo por fluidos biológicos tais como plasma, leite, líquido cefalorraquidiano, líquido amniótico e efusões tumorais ⁸⁴. Outro aspecto relevante das VEs é o fato delas possuírem as mesmas moléculas de superfície que as

células que às originaram, de modo que as VEs circulantes podem ser identificadas e correlacionadas com o tipo celular que às produziram ⁸⁴.

As VEs também atuam como transportadoras de ácidos nucleicos, tais como RNAs mensageiros (mRNAs) e miRNAs, de uma célula para outra ^{88,89}. Essa transferência horizontal de RNA tem sido correlacionada com a reprogramação celular ⁹⁰, uma vez que mRNAs oriundos de VEs podem ser reconhecidos e traduzidos em proteínas pela maquinaria traducional da células - alvo ⁹¹. Deregibus et al., 2007 ⁹² demonstraram esse mecanismo ao alvejar células progenitoras endoteliais humanas com VEs ricas em mRNA para GFP (*Green Fluorescent Protein*) que, após incorporação das VEs, passaram expressar GFP. Além disso, muitas VEs também atuam transportando miRNAs de uma célula para outra ^{88,91,93,94} e, interessante, alguns desses miRNAs são acumulado no interior das VEs de forma seletiva ⁸⁴. Bang et al., 2014 ⁸⁸ demonstraram que fibroblastos cardíacos liberam exossomos enriquecidos com miRNAs e, dentre esses, destaca-se o miR-21-3p que atua como um mediador da sinalização parácrina na hipertrofia de cardiomiócitos. São descritos mais de 1.772 miRNAs transportados por vesículas extracelulares, em diferentes tipos de amostras (<http://microvesicles.org/> versão 3.1, verificado em 14/02/2018).

1.7. Biogêneses de microvesículas e exossomos

As MVs são formadas e liberadas de forma constitutiva ⁸⁴ e sua formação pode ser desencadeada em resposta à diferentes estímulos como, por exemplo, citocinas, endocinas e estímulos físicos ⁹⁵. Em alguns casos a liberação de MVs é uma das característica da morte celular por apoptose ⁹⁶. O mecanismo que resulta na formação e liberação de vesículas é mediado por quinases, como a Rho associada com a quinase 1 (ROCK1), a qual atua na formação de “bolhas” na membrana plasmática, com posterior microvesiculação ⁹⁷. As quinases ROCK são ativadas por GTP ligado a Rho, e são importantes mediadores no processo de modificação do citoesqueleto ⁹⁷. Coleman e colaboradores (2001) ⁹⁷ observaram uma diminuição na formação de MVs em fibroblastos de camundongos e em células tumorais tratadas com um inibidor de atividade da ROCK-1; esses resultados sugerem que as quinases ROCK desempenham um papel importante na formação de MVs.

Os exossomos são formados dentro do sistema endossomal, um compartimento membranoso que separa as várias vesículas intraluminais, e as direciona para o fim apropriado

(para uma revisão, ver Akers et al., 2013)⁹⁸. Os endossomos são subdivididos em três subtipos distintos: endossomo precoce, tardio e de reciclagem⁹⁸. O endossomo precoce recebe as vesículas provenientes da endocitose ou da rede transGolgi por meio de fusão e incorporação do conteúdo dessas vesículas⁹⁸. Em seguida, os componentes que são destinados à reciclagem são novamente compartimentalizados em vesículas pelo endossomo precoce e, subsequentemente, encaminhados até a membrana plasmática, para que essas vesículas liberem seu conteúdo para meio extracelular; essas vesículas são chamadas de endossomos de reciclagem⁹⁸. Os endossomos remanescentes, aqueles que não foram encaminhados à reciclagem, são submetidos a uma série de transformações e, ao final desse processo, passam a ser denominados de endossomos tardios⁹⁸. Posteriormente, o endossomo tardio sofre invaginações, que se desprendem, formando pequenas vesículas de 40-100 nm no seu interior, passando a ser denominado de corpo multivesicular (MVB)⁹⁹. Esses MVBs podem ser direcionados para a degradação pelos lisossomos, ou então, se fundem com a membrana plasmática liberando suas vesículas internas para o meio extracelular, as quais passam a ser denominadas de exossomos⁹⁸ (**Figura 2a**).

Mais detalhadamente, a formação dos MVBs envolve dois processos distintos. O primeiro processo está envolvido na reorganização da membrana plasmática em sítios enriquecidos com tetraspaninas, denominados microdomínios enriquecidos com tetraspanina (TEMs), os quais são necessários para interação proteína-proteína¹⁰⁰. Dentre as tetraspaninas, destacam-se a CD9 e a CD63, que além de desempenharem um papel indispensável na formação das vesículas dentro do MVB, também são usadas como marcadores de exossomos em fluidos biológicos^{75,98} (**Figura 2b**).

A segunda etapa na formação de MVB está relacionado com os complexos chamados de *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport* (ESCRT)⁹⁸. Existem quatro complexos ESCRT (0, I, II, e III), os quais são necessários para a formação de MVB¹⁰¹. A presença elevada de fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP3) nas membranas endossomais primárias induzem o recrutamento de ESCRT-I e II, que resulta no dobramento e brotamento da membrana⁹⁸. Posteriormente, ESCRT-III é recrutado pelo ESCRT-I e II e pela Alix, que se ligam simultaneamente ao TSG101 (componente do complexo ESCRT-I) e ao CHAMP4 (componente do complexo ESCRT-III), que finaliza o processo de formação das vesículas internalizadas^{98,102-104}.

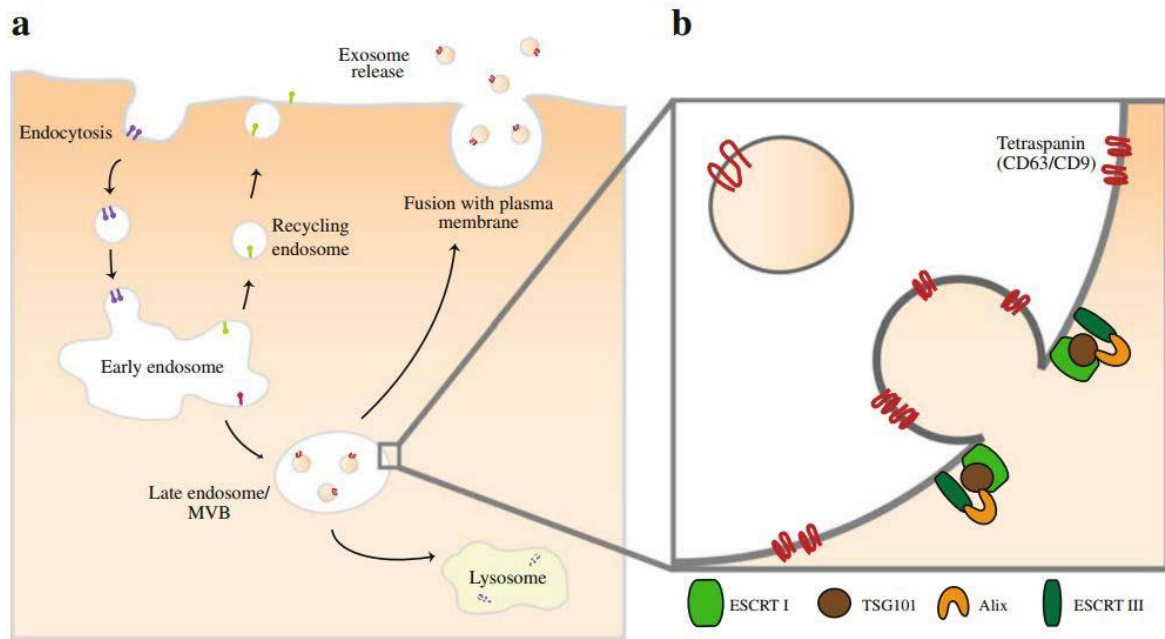


Figura 2. Biogênese e liberação de exossomos. a) Exossomos são formados no interior da rede endossomal. O endossomo primário se funde com as vesículas endocíticas e incorpora seu conteúdo conduzindo-os a reciclagem, degradação ou exocitose. Os endossomos tardios, ou corpos multivesiculares (MVB), se desenvolvem a partir do endossomo primário e são caracterizados pela presença de múltiplas vesículas interluminais chamadas de exossomos. Os exossomos são liberados através da fusão do endossomo tardio com a membrana plasmática. b) As vesículas intraluminais são formadas pela reorganização das proteínas da membrana endossomal, como CD9 e CD63 dentro de domínios ricos em tetraspaninas. Em seguida, uma série de *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* (ou ESCRTs) são recrutados para o local de brotamento. (Adaptado de Akers et al. 2013⁹⁸).

1.8. MicroRNAs em Vesículas Extracelulares no Tecido Muscular

O conhecimento sobre a ação das vesículas extracelulares tem avançando muito, principalmente no músculo cardíaco (para revisão, ver Waldenström & Ronquist, 2014¹⁰⁵). Essas vesículas extracelulares podem transportar miRNAs cardíacos que controlam importantes processos na remodelação após infarto (para revisão, ver Sahoo & Losordo, 2014¹⁰⁶). De fato, já foram identificados os miRNAs miR-126, -130a, -210, -133, -146a, -21, -22, -24, -210 e -320 sendo transportados por vesículas extracelulares e com ação em diferentes vias moleculares no músculo cardíaco (revisado em Ailawadi *et al.*, 2014¹⁰⁷). Dentre os trabalhos, destaca-se o estudo realizado por Bang *et al.*, 2014⁸⁸, que demonstrou que fibroblastos cardíacos liberam exossomos enriquecidos com miRNAs e, dentre esses miRNAs, destaca-se o miR-21 como um

importante mediador da sinalização parácrina na hipertrofia de cardiomiócitos. Além disso, Kevin A et al. (2017) ¹⁰⁸ descrevem os miRNAs miR-1, -21, -24, -29b, -133a e b, -199, -208, -214, e o -499 como participantes de um mecanismo de comunicação entre cardíaco e o músculo esquelético.

Apesar da grande maioria dos trabalhos se restringirem ao estudo do músculo estriado cardíaco, evidências sugerem que esse mecanismo de transporte de miRNAs por meio de vesículas também seja fundamental na manutenção do músculo estriado esquelético ¹⁰⁹, bem como na comunicação desse tecido com outros órgãos, como o fígado e o pâncreas ¹¹⁰. De fato, He *et al.* 2014 ¹¹¹, demonstraram que na caquexia associada ao câncer, as células tumorais produzem vesículas extracelulares enriquecidas com miR-21, o qual é capaz de induzir apoptose em mioblastos. Ainda nesse contexto, Forterre *et al.*, 2014 ¹¹² realizaram uma análise do perfil de miRNAs em mioblastos e miotubos e compararam com o perfil de miRNAs dos exossomos liberados por essas mesmas células. Esses autores identificaram 3 miRNAs mais enriquecidos em exossomos do que nos próprios mioblastos, e 2 miRNAs mais abundantes em exossomos do que em miotubos. Além disso, os autores também demonstraram que esses miRNAs transportados por exossomos oriundos de miotubos inibem a proliferação de mioblastos através da repressão do gene *Sirt1*. Esses resultados sugerem o envolvimento dos miRNAs transportados por exossomos no processo de diferenciação de mioblastos em miotubos ¹¹². Recentemente, foi demonstrado que os miRNAs miR-23a e miR-182 estão presentes em exossomos isolados do meio de cultura de miotubos C2C12, e que o tratamento com o glicocorticóide dexametasona, o qual induz atrofia das células musculares, aumenta a quantidade desses miRNAs nos exossomos ^{113,114}. Evidências sugerem que exossomos musculares enriquecidos com Miostatina, um regulador negativo do crescimento muscular, inibem indiretamente a expressão do miR-218, um importante componente da diferenciação de osteoblastos, demonstrando assim um novo mecanismo de comunicação músculo-osso ¹¹⁵.

Sendo assim, além do papel inquestionável dos miRNAs em importantes processos celulares e moleculares do músculo esquelético (revisado em Sharma *et al.*, 2014 ¹¹⁶), sua importância se intensifica ainda mais quando observamos que esses miRNAs podem ser transportados de forma específica e direcionada para células ou tecidos alvo por meio de exossomos, em diferentes condições atroficas.

1.9. Hipótese

Como 1) os níveis plasmáticos de TNF- α encontram-se elevados em várias doenças crônicas com atrofia do músculo esquelético; 2) TNF- α possui um papel fundamental, principalmente no desenvolvimento de alterações celulares e moleculares que resultam na perda de função e massa muscular na caquexia; 3) RNAs controlam importantes processos celulares e moleculares do tecido muscular; 4) RNAs musculares podem ser transportados de forma específica para células ou tecidos alvos, por meio dos exossomos. A hipótese do presente trabalho é que células musculares com atrofia induzida por TNF- α liberem um conteúdo de RNAs específicos via exossomos, permitindo identificar moléculas sinalizadoras e reguladoras que, de forma seletiva, alteram a expressão de genes em mioblastos e miotubos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi caracterizar RNAs transportados por exossomos de miotubos C2C12 com atrofia induzida por TNF- α , e avaliar a ação desses exossomos na expressão gênica de mioblastos e miotubos C2C12.

2.2. Objetivos Específicos

Utilizando-se de miotubos C2C12 com atrofia induzida por TNF- α :

- 2.2.1. Isolar, caracterizar e quantificar exossomos presentes no meio de cultivo;
- 2.2.2. Avaliar o efeito do tratamento com exossomos na proliferação/migração de mioblastos e na atrofia de miotubos;
- 2.2.3. Caracterizar o perfil global das principais classes de RNAs presentes nos exossomos;
- 2.2.4. Identificar *in silico* os possíveis genes alvos dos miRNAs mais abundantes nos exossomos.

3. Material e métodos

3.1 Cultura celular

Para esse estudo foi utilizada a linhagem de mioblastos de camundongo C2C12. Essa linhagem celular é uma importante ferramenta para o estudo da atrofia muscular, pois expressa importantes vias celulares e moleculares do músculo esquelético e, além disso, possui uma extensa quantidade de dados disponíveis, incluindo dados de microarray e RNA-Seq¹¹⁷⁻¹²¹. A linhagem celular C2C12 foi obtida do banco de células do Rio de Janeiro e mantida com meio de crescimento DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco - Life Technologies, EUA) com 20% de soro fetal bovino - FCS (Life Technologies, EUA) e 1% de antibióticos-antimicótico (penicilina e estreptomicina, Life Technologies, EUA). A diferenciação de mioblastos para miotubos foi realizada com a substituição do meio de crescimento por meio de diferenciação (DMEM, 2% de soro de cavalo e 1 % de antibiótico).

Para obtenção dos exossomos de miotubos tratados com TNF- α , 32 garrafas de 75 cm² foram semeadas com $2,08 \times 10^4$ de mioblastos C2C12. Após atingirem confluência de 80%, o meio foi substituído por meio de diferenciação. Após 6 dias de diferenciação, 16 garrafas foram tratadas com 10ng/mL de TNF- α por 18h para induzir atrofia. Outras 16 garrafas controles foram cultivadas sob o mesmo protocolo, entretanto, sem a adição de TNF- α . O tempo de tratamento foi determinado com base em análises prévias do nosso grupo de pesquisa que verificou aumento significativo na expressão gênica e proteica de atrogenes, como o Trim63 (tripartite motif-containing 63) e Fbxo32 (F-box protein 32). Para evitar os efeitos de exossomos exógenos pré-existentes no soro de cavalo e fetal bovino utilizados nos experimentos, nós centrifugamos todo o soro utilizado nos tratamentos a 160.000 x g por 8h para remoção de vesículas extracelulares.

3.2. Purificação de exossomos liberados em meio de cultivo

O meio de diferenciação utilizado nas 16 garrafas tratadas com TNF- α foram reunidos em um único recipiente, e em um outro o meio das garrafas controles. Inicialmente, o meio de cada garrafa (controle e tratada TNF- α) foi centrifugado a 2.000 g por 20 minutos, o sobrenadante foi transferido para novos tubos e centrifugado novamente a 16.500 g por 20

minutos, para remoção de células em suspensão, corpos apoptóticos e microvesículas. Em seguida, o meio foi filtrado utilizando filtro de 0,22 µm, seguido de centrifugação a 120.000 g, por 70 min, a 4 °C. O pellet rico em exossomos foi lavado por 2 vezes com PBS e, finalmente, ressuspenso em 500 µL de PBS e armazenado a -80 °C.

3.3. Microscopia eletrônica de transmissão

Para confirmar se o protocolo empregado para o isolamento de exossomos foi capaz de obter vesículas com tamanho esperado, uma alíquota foi submetida à microscopia eletrônica de transmissão. Os exossomos foram marcados usando o protocolo descrito por Lässer, C. et al. (2012)¹²², com pequenas modificações. Resumidamente, foi colocado uma gota de 30 µL de exossomos ressuspenso em PBS sobre folha de parafilme, sobre ela foi posicionado suavemente uma grade de níquel revestida de carbono, a qual foi mantida nessa posição por 60 min. A grade de níquel foi lavada com 3 gotas de PBS, transferindo-a de uma gota para outra a cada 1 minuto. A grade com os exossomos foi fixada em 2,5% de glutaraldeído por 10 minutos e, em seguida, lavada com água destilada. A amostra foi contrastada com 2% de acetato de uranilo, por 15 minutos, seguido por 0,13% de metilcelulose e 0,4% de acetato de uranilo, por 10 minutos. O excesso de líquido foi removido suavemente usando um papel absorvente e posteriormente secado ao ar livre, por 5 minutos. As grades foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão CM100 (Phillips, NL) do Centro de Microscopia Eletrônica - CME - IBB – UNESP e fotografadas. As imagens foram analisadas no ImageJ ® (<http://imagej.nih.gov/ij/>), para obtenção do diâmetro das vesículas.

3.4. Quantificação dos exossomos

Os exossomos foram quantificados em placa de 96 poços utilizando o kit ExoELISA para o marcador de exossomo CD63 (System Biosciences, USA), conforme recomendações do fabricante. Primeiramente, o anticorpo primário para CD63 foi ligado aos exossomos; em seguida, foi acrescentado o anticorpo secundário conjugado com peroxidase. A revelação foi dada pelo acréscimo do substrato colorimétrico Extra-sensitive TMB, e incubado a 37 °C por uma hora. Finalmente, a placa foi analisada por leitora de placa de microtitulação (BioTek,

USA), no comprimento de onda de 450 nm. A quantificação foi dada por meio da equação de reta gerada a partir da curva padrão preparada paralelamente com as amostras.

3.5. *Marcação por PKH67*

Para verificar a capacidade dos exossomos de serem capturados por células alvos após terem sido isolados, os mesmos foram marcados com o corante fluorescente PKH67 (Sigma, USA), conforme as recomendações do fabricante. Em seguida, os exossomos foram centrifugados utilizando o mesmo protocolo de isolamento (já descrito anteriormente), para remover o corante que não se ligou aos exossomos. Em seguida, os exossomos marcados foram colocados em cultura de mioblastos C2C12, por 24 horas. Além disso, foram realizados três controles: o primeiro consistiu em deixar o meio de cultivo celular com exossomos corados a 4° C, para verificar se os exossomos poderiam entrar nas células alvos aleatoriamente; o segundo e o terceiro controles foram realizados tratando-se os mioblastos apenas com o corante PKH67, sendo um deles mantido a 4°C, e o outro a 37° C, para verificar se o corante por si só poderia corar os mioblastos. Por fim, os núcleos foram marcados com DAPI e, posteriormente, analisados em microscópio de fluorescência BX61 (Olympus, USA) para verificar se os exossomos foram internalizados pelos mioblastos. Foram coletadas fotos para as duas marcações (PKH67 e DAPI) e posteriormente sobrepostas a fim de gerar uma imagem única.

3.6. *Exposição dos mioblastos e miotubos aos exossomos isolados*

Mioblastos e miotubos foram cultivados em placas de 6 poços utilizando-se soro de cavalo e soro fetal bovino livres de exossomos, respectivamente. Para cada poço, contendo mioblastos ou miotubos, foram acrescentados 2×10^7 exossomos. Foram utilizados dois controles para cada ensaio com mioblasto ou miotubo: um foi constituído a partir do excipiente utilizado para diluir os exossomos (*Phosphate Buffered Saline* - PBS); e o outro controle foi constituído de exossomos de miotubos que não foram tratados com TNF- α . As placas foram mantidas em estufa nas condições adequadas por 24 horas. Após esse período, as células foram estocadas a -80°C para posterior extração do RNA total.

3.7. Ensaio de Migração/Proliferação – Wound Healing

O ensaio *Wound Healing* foi um dos primeiros experimentos desenvolvidos para a análise *in vitro* de migração/proliferação celular ¹²³. Para realização desse ensaio, mioblastos C2C12 foram cultivadas em placas de 6 poços na concentração de 4×10^4 células/cm². Após terem atingido confluência equivalente a 100%, foi realizada uma linha reta no maior diâmetro de cada poço utilizando uma ponteira estéril de 200uL (simulando um ferimento), para retirada de todas as células aderidas. A área lesada foi avaliada em 0, 6, 12 e 24 horas, em microscópio invertido de contraste de fase Axio Vert.A1 (Zeiss, GER). A velocidade de preenchimento do espaço da lesão na placa de cultura foi calculada comparando área inicial com a área remanescente, após cada período, até seu fechamento total. Cada momento foi fotografado para obtenção das medidas de área, a qual foi realizada utilizando o programa ImageJ® (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

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

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do *MIQE: Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment* ¹²⁴.

a) Extração de RNA total: O RNA total de miotubos, mioblastos e exossomos isolados foram extraídos utilizando Trizol (*Life Technologies*, EUA), conforme orientações do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com TURBO DNase (*Ambion*, EUA) para remover a contaminação com DNA genômico. O RNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoVue (*GE Life Sciences*, EUA).

b) Análise da qualidade do RNA: A qualidade do RNA foi obtida pelo número da integridade do RNA (*RNA Integrity Number, RIN*), a partir da análise dos RNAs ribossomais utilizando-se o sistema *2100 Bioanalyzer* (*Agilent*, EUA) ¹²⁵. Diante da baixa concentração de RNA obtido dos exossomos, não foi realizada a análise de RIN para essas amostras.

c) Reação de Transcrição Reversa (miRNA): A transcrição reversa dos miRNAs obtidos dos exossomos foi realizada utilizando o kit *TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Life Technologies, EUA) combinado com o *Stem-loop Megaplex[™] RT Primers* (Life Technologies, EUA), seguindo de pré-amplificação conforme orientações do fabricante. As condições de termociclagem foram as mesmas indicadas pelo fabricante.

d) PCR quantitativo em Tempo Real (miRNA): Cada amostra pré-amplificada foi analisada utilizando o *TaqMan Low Density Array Rodent MicroRNA A+B Cards Set v3.0* (Life Technologies, EUA) que permite a identificação de 641 miRNAs maduros. As condições de termociclagem foram as mesmas indicada pelo fabricante. Os miRNA considerados relevantes foram aqueles que obtiveram valor de Cq (ciclo de quantificação) maior ou igual a 25.

e) Reação de Transcrição Reversa (mRNA): A transcrição reversa para mRNA foi realizada utilizando o kit *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante para um volume total de 20 µL. As condições de termociclagem foram as mesmas indicada pelo fabricante.

f) PCR quantitativo em Tempo Real (mRNA): Cada amostra de cDNA foi analisada com ensaios *SYBRgreen* (Life Technologies, EUA), contendo primers específicos para o(s) mRNA alvo(s) e *SYBRgreen Universal PCR Master Mix, No AmpErase[®] UNG (2X)* (Life Technologies, EUA) numa reação total de 20 µL. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada utilizando o método de Cq comparativo ¹²⁶.

3.9. Sequenciamento de RNA total em larga escala (RNA-Seq)

Foram utilizados aproximadamente 6ng de RNA total para o sequenciamento em larga escala, sem depletar os RNAs ribossomais. A fragmentação do RNA, síntese da primeira e da segunda fita de cDNA, reparo das fitas de cDNA, adenilação, indexação e ligação dos adaptadores foram realizadas utilizando o kit *TruSeq[™] Stranded Total RNA sample preparation* (Illumina, USA), segundo recomendações do fabricante. As amostras (bibliotecas) foram adicionadas na *flowcell* para formação de clusters, e posterior sequenciamento em larga

escala. O sequenciamento (RNA-Seq) foi realizado na plataforma *NextSeq 500 System* (Illumina, USA) por meio do kit de sequenciamento *NextSeq 500/550 High Output v2 150 cycles* (Illumina, USA). Cada molécula foi sequenciada em ambas as extremidades (pair-end) e os fragmentos resultantes foram de aproximadamente de 160 pares de bases, sendo 80pb por extremidade.

Os dados gerados no sequenciamento foram carregados automaticamente para a nuvem da Illumina, Basespace, para posterior análise. As *reads paired-end* foram alinhadas e em seguida pareadas com o genoma de *Mus musculus* (mm10) utilizando o TopHat2 ¹²⁷ e a contagem de genes RefSeq foram obtidas utilizando o HTseq2 ¹²⁸ e a contagem de reads normalizada usando DESeq2 (version 1.4) ¹²⁹.

3.10. Reanálise de dados de expressão gênica global por microarrays

Os dados de RNAs obtidos de exossomos foram correlacionados com dados reanalisados de dois experimentos de expressão global de mRNAs, por *microarrays*, de células miogênicas. O primeiro conjunto de dados foi obtido a partir do tratamento de miotubos (24h de diferenciação) (linhagem PMI28) com TNF- α (2×10^3 U/mL), nos tempos de 4, 12 e 24h. Os dados brutos desse experimento foram disponibilizados online por Mayer, et al. (2015) ¹³⁰ em ArrayExpress ¹³¹ (www.ebi.ac.uk/arrayexpress), sob número de acesso E-MTAB-3474. O segundo conjunto de dados foi obtido a partir de experimento analisou diferentes períodos de proliferação e diferenciação de mioblastos C2C12, desde dois dias antes do início da diferenciação até 10 dias após início da diferenciação (-2, -1, 0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias). Os dados de *microarrays* desse experimento foram disponibilizados online por Tomczak, et al. (2004) ¹³² em *Gene Expression Omnibus* ¹³³ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) sob número de acesso GSE989.

Antes de compararmos os experimentos disponíveis entre si, analisamos a expressão gênica de cada um separadamente. Para o experimento que tratou células PMI28 com TNF- α , nós obtivemos os genes diferencialmente expressos utilizando o protocolo LIMMA (Linear Models for Microarray Data) ¹³⁴, utilizando como controle os miotubos 24h sem tratamento, os quais foram comparados com os miotubos tratados com TNF α por 4, 12 e 24h. Para o segundo experimento foi utilizado o script GEO2R ¹³³ disponível online (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>), no qual comparamos miotubos com 4 dias de

diferenciação com miotubos com 6, 8 e 10 dias de diferenciação. Para ambos experimentos, consideramos diferencialmente expresso apenas os genes que tiveram valor de *Fold Change* $\log_2 \geq 0.5849$ ou ≤ -0.5849 (o mesmo que *Fold Change* de 1,5). Em seguida, pareamos os genes identificados anteriormente nos dois experimentos, e selecionamos apenas os transcritos que apresentavam alteração de expressão no grupo tratado com TNF- α .

Para análise da ontologia dos genes diferencialmente expressos, nós utilizamos o *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org/>) em busca de termos enriquecidos, utilizando correção de Bonferroni e aceitando apenas termos com valor de $p \leq 0.05$. Também utilizamos a ferramenta online REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>) para remover termos redundantes e condensar termos em comum.

3.11. Predição de alvos de miRNAs

A fim de identificar possíveis alvos dos miRNAs diferencialmente expressos por RT-qPCR, foi utilizado o miRWalk 2.0, que reúne dados de predição de alvos gerado por diferentes algoritmos (inclusive algoritmo próprio)¹³⁵. Dentre eles, selecionados 6 algoritmos distintos (miRWalk, miRDB, MicroT4, miRanda, RNAhybrid e Targtscan) para eleger os possíveis alvos. Aceitamos apenas alvos que foram preditos por pelo menos 3 dos algoritmos selecionados. Em seguida, verificamos se os alvos preditos estavam expressos e se estavam alterados em miotubos tratados com TNF- α (descrito anteriormente). Também, verificamos se as interações foram validadas experimentalmente, utilizando o banco de dados do miRTarBase¹³⁶. Por fim, pesquisamos no PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> em 20/10/2017) e bancos de dados Vesiclepedia (<http://microvesicles.org/> em 21/10/2017), ExoCarta (<http://www.exocarta.org/> 22/07/2017) e EVpedia (<http://evpedia.info/> em 23/10/2017)¹³⁷ se a presença dos miRNAs alterados já foi relatada em exossomos.

3.12. Análise estatística dos dados

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (SD). A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prisma v 6.07 (GraphPad Software, Inc., EUA). Para todas as análises estatísticas não descritas em outro local, utilizamos um teste não paramétrico, Mann Whitney. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Tratamento com TNF- α induz atrofia de miotubos C2C12

Avaliamos por RT-qPCR a expressão de genes relacionados com os processos de atrofia, proliferação e diferenciação celular (**Figura 3**). Esses dados demonstraram um aumento na expressão dos genes de atrofia (atrogenes) *Fbox32* e *Trim63*, bem com diminuição na expressão dos genes *MyoD* e *MyhIIa*, os quais estão envolvidos com diferenciação de células musculares.

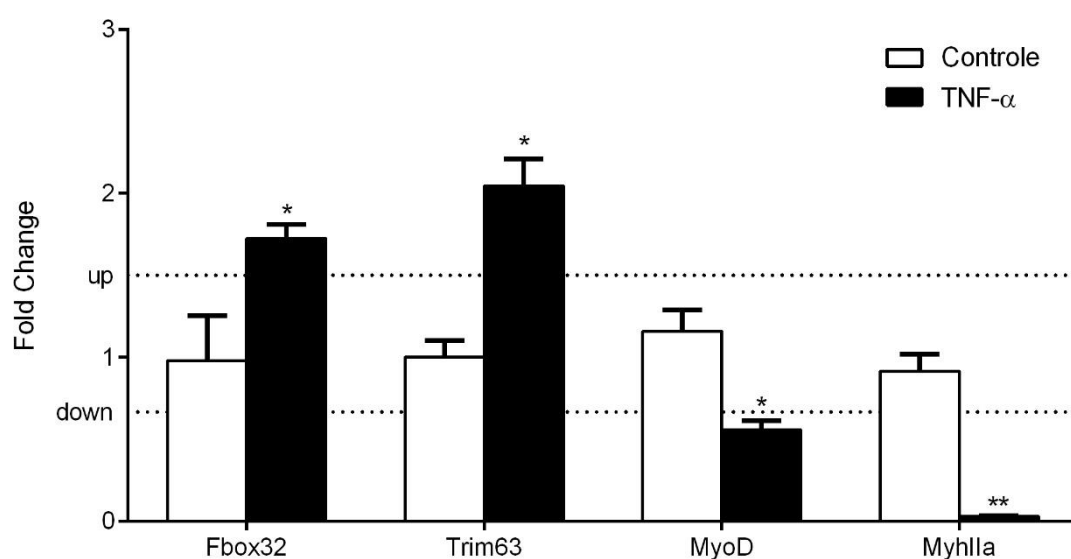


Figura 3. Nível de expressão, por RT-qPCR, de genes marcadores de atrofia. Foram analisados os genes *Fbox32* (Ubiquitin E3 ligase atrogenin-1), *Trim63* (tripartite motif-containing 63), *Myod1* (myogenic differentiation 1) e *MyhIIa* (myosin heavy chain 2) em miotubos C2C12 tratadas com TNF e seu respectivo controle. As linhas tracejadas indicam se o gene está regulado positivamente (up) ou negativamente (down). Como normalizadores foram utilizados os genes *Ppia* e *Ppib*. Para cada grupo foi utilizado o n=6. Os valores são expressos em *fold change* (média \pm desvio padrão). * p <0,05; ** p <0,001: significância estatística versus grupo controle.

4.2. Quantificação e caracterização dos exossomos

Obtivemos a concentração de $3,86 \times 10^9$ exo/mL (exossomos por mililitro) provenientes do meio de cultura dos miotubos C2C12 tratados com TNF- α , e $4,27 \times 10^9$ exo/mL do meio cultura dos miotubos controles, os quais não receberam tratamento com TNF- α . Ambos grupos de exossomos foram quantificados utilizando a proteína de superfície CD63.

Além disso, avaliamos quanto a homogeneidade das vesículas isoladas, e se as mesmas correspondiam com o tamanho esperado para exossomos (40-150 nm) ^{79,138}. Mais de 100 vesículas foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão, as quais apresentaram tamanho de $67,76 \pm 14,96$ nm (média \pm desvio padrão), correspondendo ao esperado para exossomos ¹³⁸ (**Figura 04**). Além disso, essa análise por microscopia eletrônica de transmissão permitiu a identificação de alguns exossomos com formato de hemácia, um artefato característico de exossomos neste tipo de análise (**Figura 04 C**).

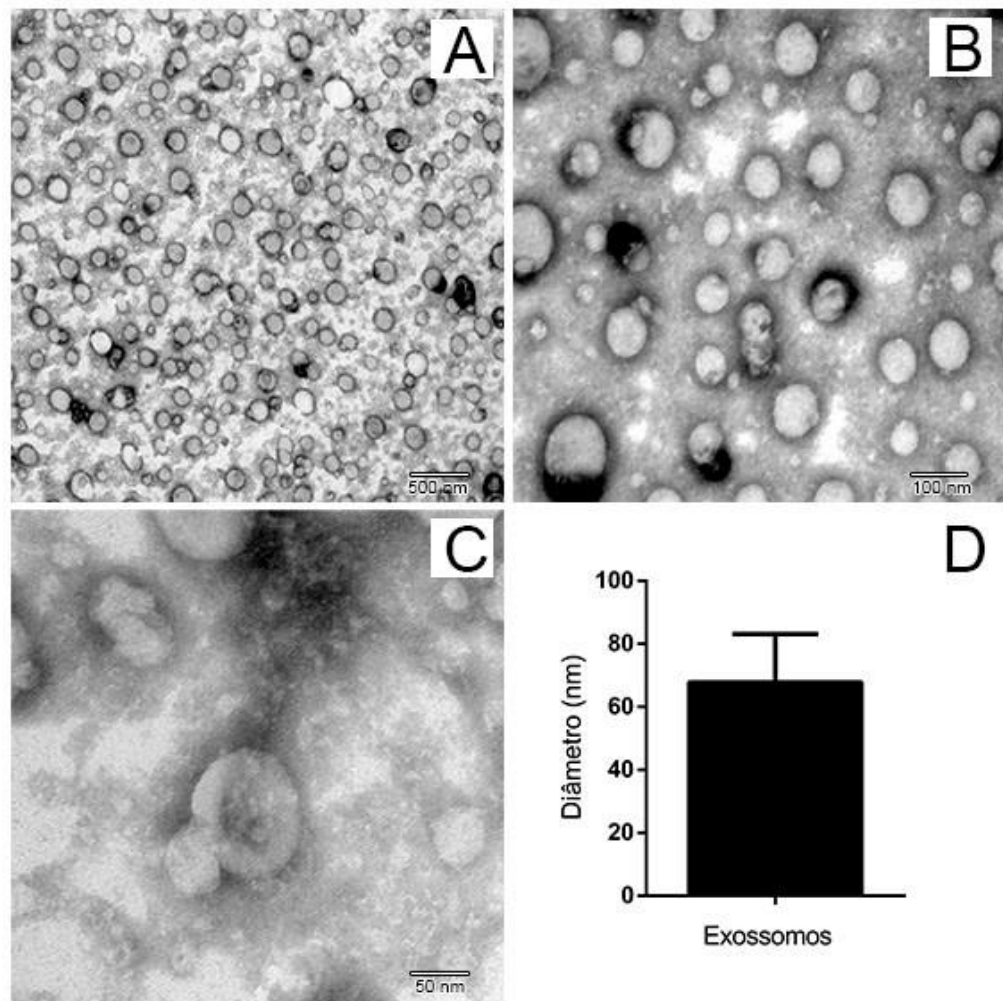


Figura 4. Análise de exossomos por microscopia eletrônica de transmissão. A) região avaliada com abundância de exossomos isolados. B) detalhe demonstrando exossomos com diferentes tamanhos. C) exossomos no centro da imagem com formato parecido com uma hemácia, artefato característico para vesícula em preparações para microscopia eletrônica de transmissão. D) Diâmetro médio dos exossomos obtidos (n=100).

4.3. Exossomos isolados são viáveis e capazes de serem capturados pelas células receptoras

Nossos resultados demonstraram que o método de obtenção de exossomos baseado em ultracentrifugação foi eficaz na preservação da capacidade dos exossomos de serem reconhecidos e capturados pelas células-alvo (mioblastos). Além disso, demonstramos que a captura dos exossomos pelos mioblastos ocorreu de forma ativa (**Figura 5a e 5c**).

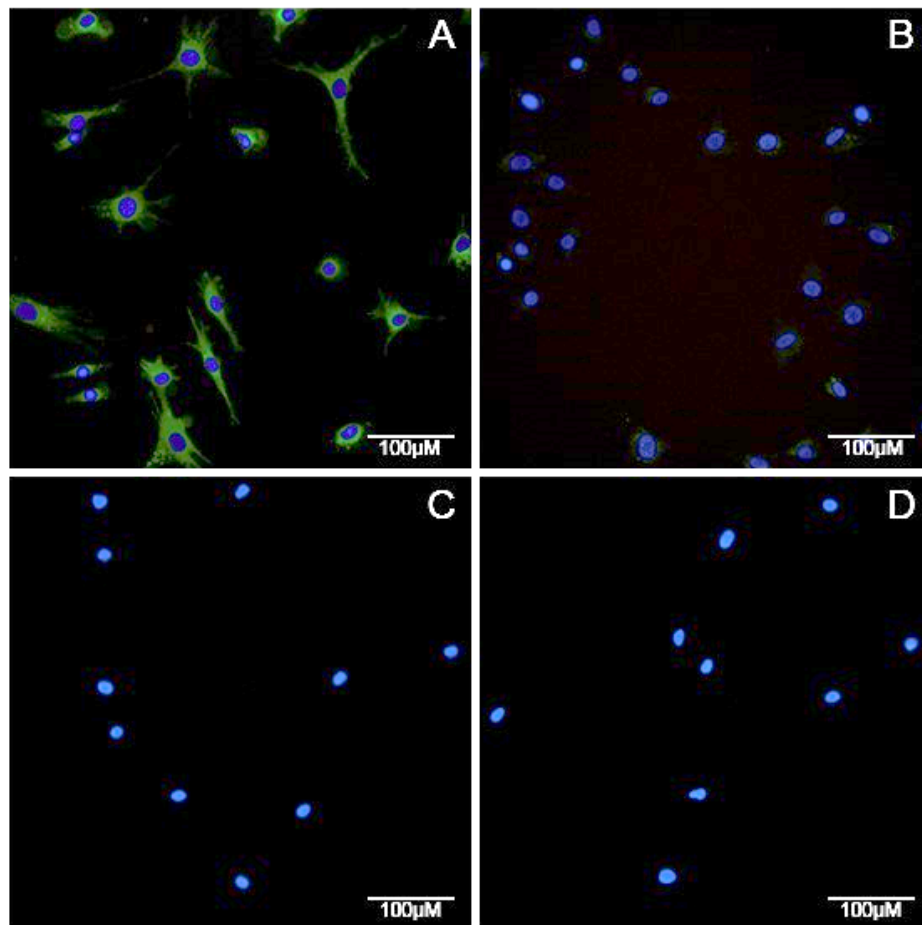


Figura 5. Capacidade dos exossomos derivados de miotubos C2C12 serem reconhecidos e capturados de forma ativa por mioblastos C2C12. Núcleos foram corados com DAPI (azul) e os exossomos com PKH67 (verde). A) Exossomos corados com PKH67 foram acrescentados a cultura de mioblastos e mantida em condições ótimas (37° C a 5% de CO₂). Os exossomos foram reconhecidos e absorvidos marcando o citoplasma dos mioblastos (verde); B) Corante PKH67 sem exossomos em condições ótimas; C) Exossomos corados com PKH67 mantido a 4°C; e D) Corante PKH67 sem exossomos mantido a 4°C não foram capazes de marcar o citoplasma de mioblastos C2C12.

4.4. Exossomos alteram expressão gênica de mioblastos e miotubos

Avaliamos em mioblastos C2C12, por RT-qPCR, a expressão dos transcritos *Ccnd1*, *Top2a*, *MyoG* e *Zeb1*, os quais são envolvidos com a proliferação e diferenciação celular (**Figura 6**). Observamos que tanto exossomos provenientes de miotubos controles quanto miotubos tratados com TNF- α (Exo-CT e Exo-TNF α) foram capazes de diminuir a expressão do gene *Ccnd1* em mioblastos, que transcreve uma importante proteína necessária para progressão da fase G1 do ciclo celular¹³⁹. A *MyoG* se mostrou aumentada em exossomos controles (Exo-CT), e a expressão de *Top2a* e *Zeb1* não alterou em Exo-CT ou Exo-TNF α . Quanto aos miotubos, o tratamento com os exossomos não alterou a expressão dos genes *Fbox32*, *Myhc1* e *Zeb1*; no entanto, *MyhcIIa* e *Tnnt1* aumentaram sua expressão em ambos tratamentos com exossomos (Exo-CT e Exo-TNF- α) (**Figura 7**).

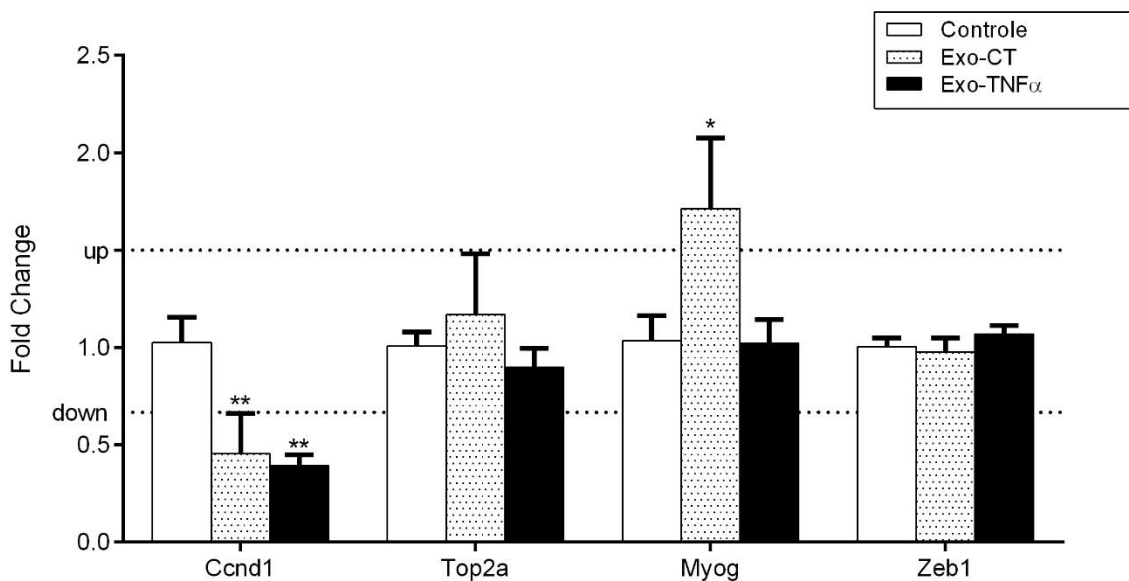


Figura 6. Nível de expressão, por qPCR, de genes envolvidos com proliferação e ciclo celular em mioblastos após tratamento com exossomos proveniente do meio de cultura de miotubos tratados com TNF- α e seu respectivo controle. Foram analisados os genes *Ccnd1*, *Top2a*, *MyoG* e *Zeb1*. As linhas tracejadas indicam se o gene está positivamente (up) ou negativamente (down) regulado, *fold change* de 1,5. Como normalizadores foram utilizados os genes *Ppia* e *Ppib*. Para cada grupo foi utilizado o n=4. Os valores são expressos em fold change média \pm desvio padrão. * p <0,05; ** p <0,01: significância estatística versus grupo controle.

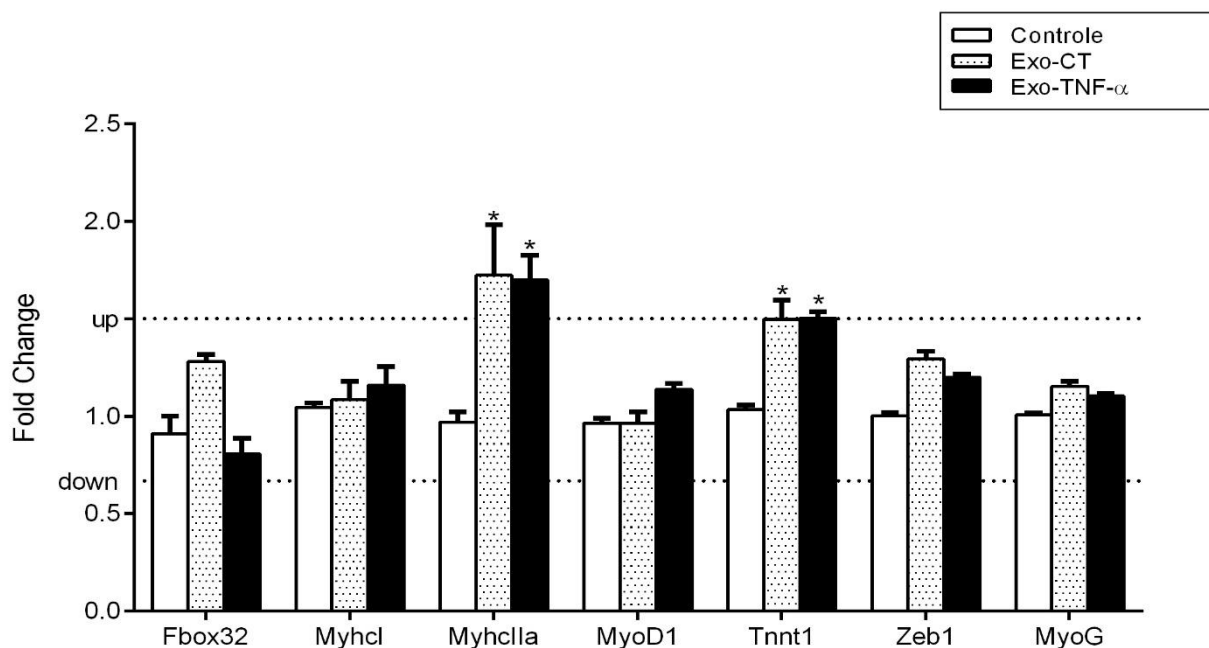


Figura 7. Nível de expressão, por qPCR, de genes envolvidos com diferenciação e atrofia. Foram analisados os mRNAs para *Fbox32*, *Myhcl*, *MyhcIIa*, *MyoD1*, *Tnnt1*, *Zeb1* e *MyoG* de miotubos tratados com exossomos proveniente de miotubos expostos a TNF- α . As linhas tracejadas indicam se o gene está positivamente (up) ou negativamente (down) regulado, *fold change* de 1,5. Como normalizadores foram utilizados os genes *Ppia* e *Ppib* (os dois mais estáveis para 20 endógenos pelo gNorm). Os valores são expressos em fold change média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$: significância estatística versus grupo controle.

4.5. Exossomos alteram a migração celular

O fechamento da “ferida” (corte) foi acompanhado nos tempos 0h, 6h, 12h e 24h, e os dados são apresentados na **figura 8**. O tratamento mostrou que exossomos oriundos de miotubos tratados com TNF- α (exo-TNF α) têm efeito negativo sobre mioblastos, diminuindo a velocidade de fechamento da ferida (risco) em relação aos mioblastos controles.

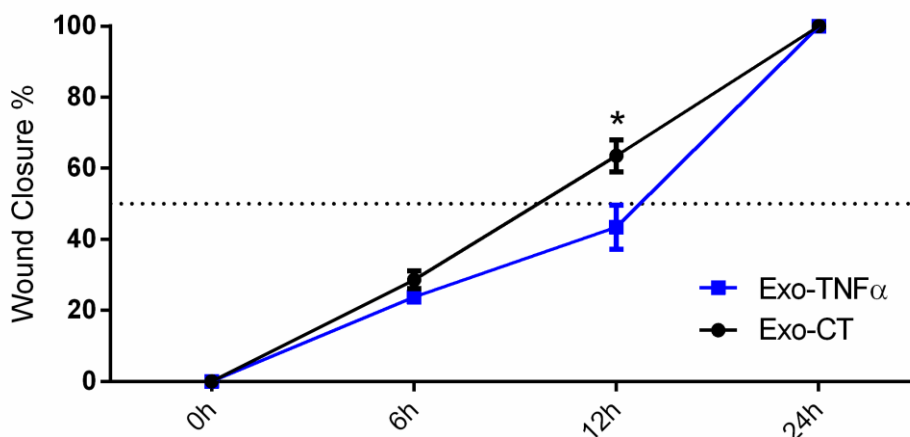


Figura 8. Migração celular foi analisada por ensaio de *Wound-Healing* após tratamento com exossomos provenientes de miotubos tratados com TNF- α nos tempos 0 h, 6h, 12 h e 24 h. O fechamento da “ferida” por mioblastos foi quantificado pela área do corte não preenchida por células nos tempos pré-estabelecidos. Os dados são expressos em porcentagem, a linha tracejada indica 50% da área fechada e as barras desvio padrão (n=4 por grupo). * p <0,05: significância estatística versus grupo Exo-CT.

4.6. Exossomos proveniente de miotubos tratados com TNF- α transportam RNAs

A partir dos exossomos obtidos de miotubos tratados com TNF- α , e seus respectivos controles, foram identificamos 44 miRNAs expressos em exossomos derivados de miotubos C2C12 (**Tabela Suplementar 1**). Para análise de expressão diferencial, os valores obtidos para cada miRNA foi normalizado utilizando método descrito por D'haene, et al (2009) ¹⁴⁰. Dentre os miRNAs analisados, 3 se apresentaram regulados positivamente e 3 negativamente (**Figura 9**).

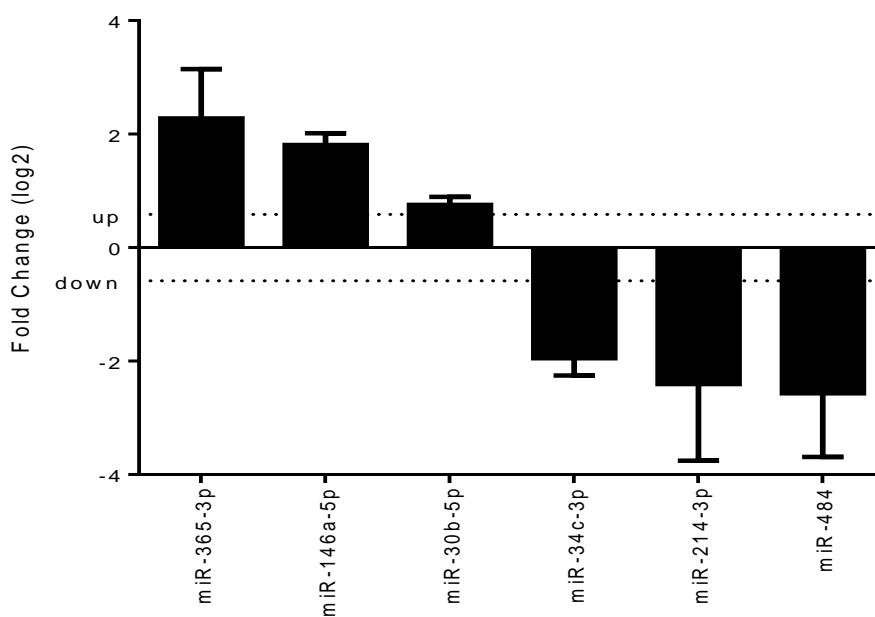


Figura 9. miRNAs diferencialmente expressos em exossomos provenientes do meio de cultura de miotubos tratados com TNF- α . Os dados são apresentados em \log_2 de *fold change* \pm desvio padrão. As linhas tracejadas indicam se o miRNA está regulado positivamente ou negativamente, número de vezes alterado foi de 1.5 em log de 2.

Além disso, análises de sequenciamento de nova geração permitiu identificar 194 transcritos em exossomos de miotubos (**Tabela complementar 2**), dos quais 24 apresentaram mais abundantes, com contagem de *Reads* igual ou superior a 10 (**Tabela 01**), e desses, 11 apresentaram expressão com variação de 8 vezes (em $\log_2 = 3$) nos exossomos provenientes de miotubos tratados com TNF- α em relação aos exossomos controles (**Tabela 2**).

Tabela 1 – Transcritos mais abundantes em exossomos de miotubos C2C12 tratado com TNF- α

Symbol	Gene Name	n Reads		
		EXO-CT	EXO-TNF	Δ Reads (log2)
Gm15662	ENSMUSG00000089855	241	434	0.85
Rpph1	Ribonuclease P RNA component H1	92	132	0.52
Mir6236	microRNA-6236	156	130	0.26
mt-Rnr2	Mitochondrially encoded 16S rRNA	1376	107	3.68
Rny3	RNA, Y3 small cytoplasmic	26	96	1.88
Rn7sk	RNA, 7SK, nuclear	42	78	0.89
Rny1	RNA, Y1 small cytoplasmic	12	72	2.58
Rprl3	Ribonuclease P RNA-like 3	49	72	0.56
Eef1a1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	11	49	2.16
mt-Rnr1	Mitochondrially encoded 12S rRNA	522	34	3.94
Fth1	Ferritin heavy polypeptide 1	1	21	4.39
Ncl	Nucleolin	8	18	1.17
Rmrp	RNA component of mitochondrial RNAase P	4	17	2.09
Ftl1	Ferritin light polypeptide 1	1	15	3.91
Rplp1	Ribosomal protein, large, P1	6	14	1.22
Cyb5r3	Cytochrome b5 reductase 3	7	13	0.89
Rpl8	Ribosomal protein L8	1	12	3.58
Gm26809	Long intergenic non-coding RNAs	5	12	1.26
Rps19	Ribosomal protein S19	2	11	2.46
Rps24	Ribosomal protein S24	4	11	1.46
Rps15	Ribosomal protein S15	1	10	3.32
Rnu11	U11 small nuclear RNA	1	10	3.32
Fn1	Fibronectin 1	2	10	2.32
Des	Desmin	4	10	1.32

Tabela 2 – Transcritos que variaram em pelo menos 8 vezes sua abundância em exossomos de miotubos C2C12 tratado com TNF- α .

Gene Name	Gene ID	n Reads		
		EXO-CT	EXO-TNF	Δ Reads (log2)
Fth1	Ferritin heavy polypeptide 1	1	21	4.39
mt-Rnr1	Mitochondrially encoded 12S rRNA	522	34	3.94
Ftl1	Ferritin light polypeptide 1	1	15	3.91
mt-Rnr2	Mitochondrially encoded 16S rRNA	1376	107	3.68
Rpl8	Ribosomal protein L8	1	12	3.58
Rps15	Ribosomal protein S15	1	10	3.32
Rnu11	U11 small nuclear RNA	1	10	3.32
Rpl41	Ribosomal protein L41	1	9	3.17
D8Ertd738e	DNA segment, Chr 8, ERATO Doi 738	9	1	3.17
Vim	Vimentin	1	8	3.00
Mt1	Metallothionein 1	1	8	3.00

Dente os transcritos mais variáveis e abundantes nos exossomos de miotubos tratados com TNF- α , nós identificamos os RNAs ribossomais mitocondriais 12S e 16S, codificados pelos genes *mt-Rnr1* e *mt-Rnr2* do DNA mitocondrial, respectivamente. Além de terem um papel notório na constituição de ribossomos, esses RNAs podem ser reconhecidos e traduzidos em peptídeos com importante papel biológico¹⁴¹. Foram relatados 8 peptídeos codificados por esses RNAs ribossomais, sendo 7 deles no RNA 16S (HN, SHLP1, SHLP2, SHLP3, SHLP4, SHLP5 e SHLP6) e 1 no RNA ribossomal 12S (MOTS-c)¹⁴¹. A localização no genoma mitocondrial desses peptídeos é representada na **figura 10**. Também analisamos se experimentalmente havia sido demonstrado que rRNA mitocondrial pode ser lido pelos ribossomos, e verificamos junto ao GWIPS-viz, que os rRNAs mitocondrial 12S e 16S foram encontrados acoplado a ribossomos com base na técnica de *Ribossomo Footprinting (Ribosome profiling)*¹⁴², evidenciando a possibilidade de tradução de rRNA ribossomal (**Figura 11**).

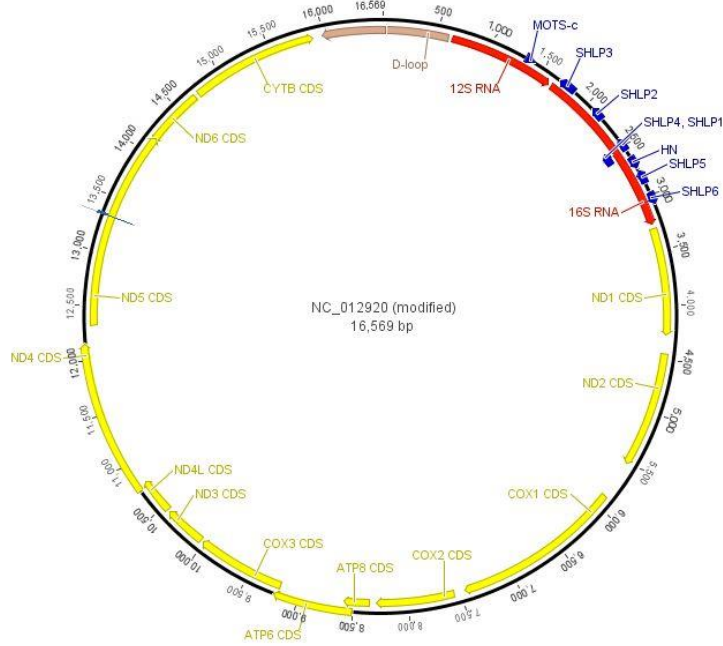


Figura 10. Esquema do DNA circular mitocondrial de humanos. Em vermelho são destacadas as posições dos RNAs ribossomais 12S e 16S; em azul a localização de cada sequência codificadora dos peptídeos HN, MOTS-c, SHLP1, SHLP2, SHLP3, SHLP4, SHLP5 e SHLP6. O esquema foi montado com base na sequência notada NC_012920 (Andrews RM, 1999 ¹⁴³).

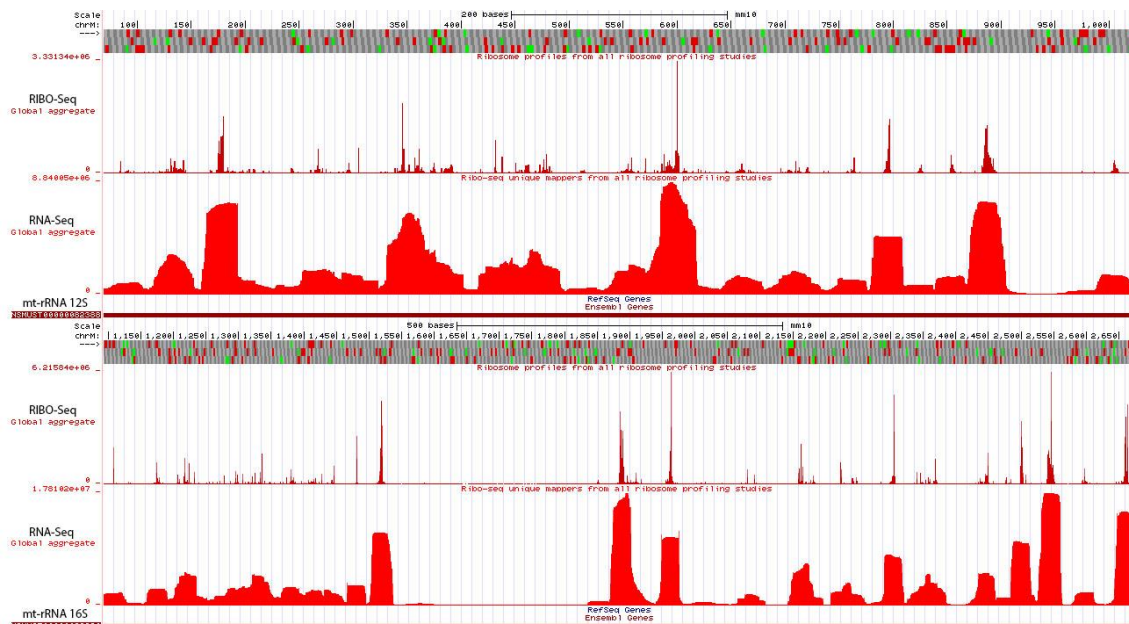


Figura 11. Análise de sequências a partir da técnica de *Ribosome Profiling* para os RNAs ribossomais 12S e 16S. Ribo-Seq apresenta sequenciamento de fragmentos acoplados a ribossomos. RNA-seq, refere-se ao sequenciamento de RNA completo.

4.7. mRNAs diferencialmente expressos em miotubos tratados com TNF- α

Na análise comparativa entre dois experimentos de expressão gênica durante a miogênese *in vitro*, por *microarrays*, permitiu identificar 124 genes diferencialmente expresso entre miotubos controles e miotubos tratados com TNF- α . Desses transcritos foram identificados 55 genes com expressão aumentada e 69 genes com expressão diminuída (**Tabelas Suplementares 3 e 4**). Utilizando análise de ontologia de genes e removendo os termos redundantes, foi possível identificar 14 vias envolvidas em processos biológicos, como *Regulation of inflammatory response* (GO:0050727), *regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process* (GO:0043281), *regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling* (GO:0043122), *Regulation of cytokine production* (GO:0001817) e *Positive regulation of cell migration* (GO:0030335) (**Figura 12**).

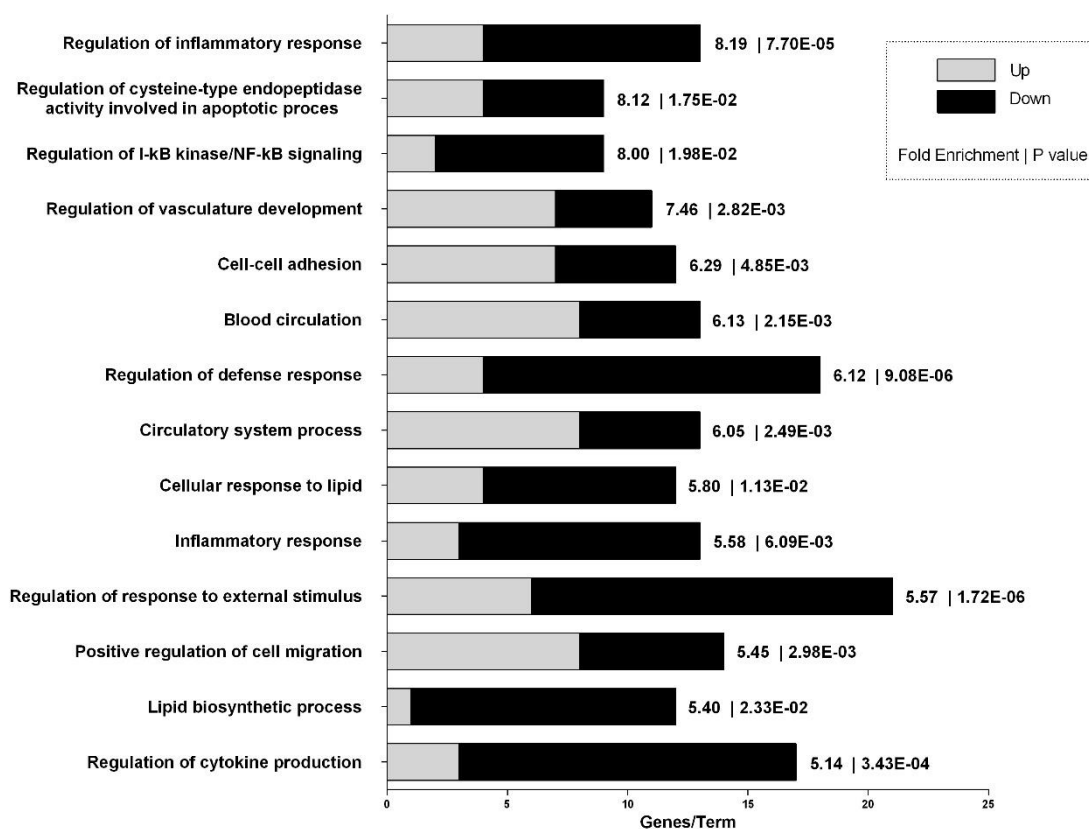


Figura 12. Análise de ontologia dos genes diferencialmente expressos em mioblastos tratados com TNF- α em busca das principais vias alteradas. As barras horizontais representam o número de genes encontrados em cada termo, sendo diferenciados em regulados positivamente e negativamente pelas cores cinza e preto, respectivamente. Os valores de número de vezes aumentado e de valor de p são apresentados aos lados das barras horizontais e separados por uma linha vertical.

4.8. Interações miRNAs e RNAs mensageiros

Alvos preditos por pelo menos três algoritmos distinto para os miRNAs diferencialmente expressos gerou uma lista de 10.588 possíveis alvos. Em seguida, comparamos se os alvos preditos apresentavam expressão inversa ao dos miRNAs identificados, em células musculares tratadas com TNF- α . Para os miRNAs regulados positivamente (miR-365-3p, -146a-5p e -30b-5p) foram identificados 23 mRNAs regulados negativamente, e para os miRNAs regulados negativamente (miR-34c-3p, -214p-3p e -484) foram identificados 24 mRNAs regulados positivamente (**figura 13** e **tabelas suplementares 5 e 6**). Nenhum dos alvos preditos apresentados no presente trabalho foram, até o momento, validados experimentalmente.

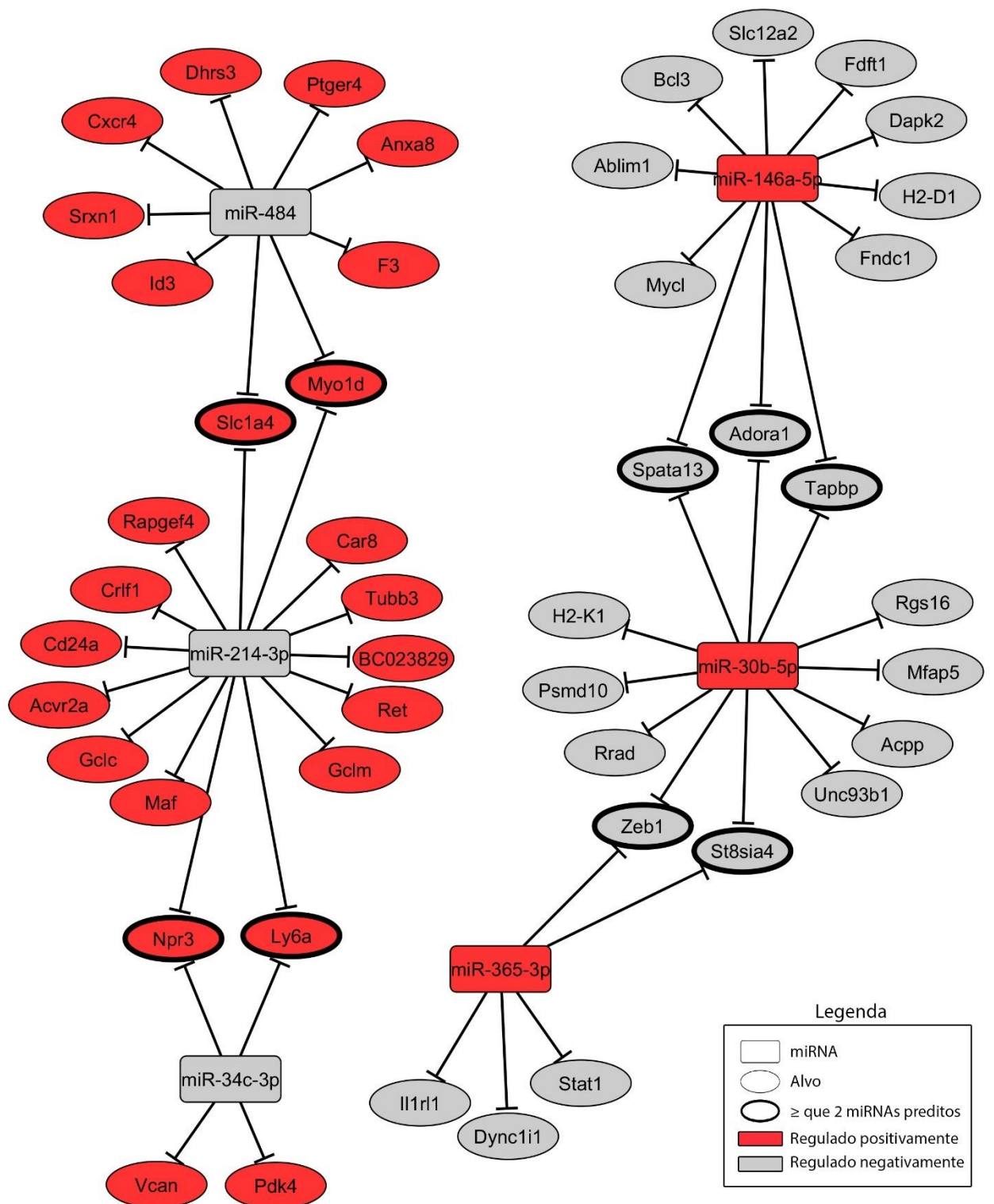


Figura 13. Alvos preditos para os miRNAs diferencialmente expressos em exossomos provenientes do meio de cultura de miotubos tratados com TNF- α . Alvos preditos por pelo menos 3 algoritmos distintos (*miRWalk*, *miRDB*, *MicroT4*, *miRanda*, *RNAhybrid* e *Targtscan*) e que se apresentavam diferencialmente expressos em miotubos tratados com TNF- α .

5. Discussão

O presente trabalho avaliou a capacidade reguladora dos exossomos produzidos por miotubos C2C12 tratados com TNF- α por 16 horas, e seus respectivos controles, sobre mioblastos e miotubos C2C12. Também caracterizou diferentes classes de RNAs no interior desses exossomos, os quais foram correlacionados com possíveis mecanismos de regulação. Nossos resultados demonstram que exossomos provenientes de miotubos são capazes de alterar a expressão genes de vias envolvidas em proliferação, migração e diferenciação de mioblastos em miotubos. Verificamos também que exossomos provenientes de miotubos tratados com TNF- α induzem uma menor capacidade de migração/proliferação de mioblastos. Além disso, identificamos que o tratamento de miotubos com TNF- α altera a quantidade relativa de seis miRNAs (mmu-mir-365-3p, -146a-5p, -30b-5p, -34c-3p, -214-3p e -484) e dois RNAs ribossomais mitocondriais (12S e 16S) no interior dos exossomos.

Os miotubos tratados com TNF- α , a partir dos quais foram isolados o exossomos, apresentavam parâmetros condizentes com atrofia; houve alteração da expressão de genes-chaves nesse processo, como a *MyoD* e a *MyhIIa*, regulados negativamente, e o *Fbox32* e o *Trim63*, regulados positivamente. A *MyoD*, em conjunto com outros membros da família de fatores de regulação miogênica (MRFs), desempenha papel fundamental na formação dos miotubos, induzindo a expressão de miosinas, como a *MyhIIa*^{16,48}. Estudos demonstram que *MyhIIa* é uma das miosinas mais abundante em miotubos C2C12, e sua expressão tende aumentar com o avanço da miogênese^{1,144}. Em contra partida, o aumento da expressão dos genes *Fbox32* e *Trim63* está diretamente correlacionado com o processos de atrofia, pois o acréscimo da expressão desses genes sinaliza a degradação de proteínas, inclusive de proteínas sarcoméricas^{16,17,145}. Dados de nosso grupo de pesquisa demonstraram que, além da alteração na expressão de *MyoD*, *MyhIIa*, *Fbox32* e *Trim63*, os miotubos C2C12 tratados com TNF- α tem redução do conteúdo proteico com consequente redução do volume celular (dados ainda não publicados).

Os exossomos proveniente do meio de cultivo desses miotubos tratados com TNF- α apresentaram diâmetro de aproximadamente 40-90 nm, além de expressarem o marcador de superfície CD63, características esperadas para essa classe de vesículas^{75,138}. Além disso, os exossomos se mantiveram viáveis, pois foram reconhecidos e capturados por mioblastos mesmo após terem sido isolados e armazenados a -80°C. De fato, os mioblastos tratados com exossomos proveniente do meio de cultura de miotubos tratados com TNF- α (Exo-TNF- α)

diminuíram a taxa de migração em relação aos mioblastos tratados com exossomos controle (Exo-CT). Experimentos com células tumorais demonstraram anteriormente que exossomos podem exercer um importante papel na motilidade e invasibilidade dessas células¹⁴⁶. Além disso, também já foi demonstrado que exossomos secretados podem ter ação autócrina, promovendo mobilidade direcional e persistente¹⁴⁷.

Em nossos experimentos, verificamos que ambos exossomos Exo-CT e Exo-TNF α promovem a diminuição da expressão do gene *Ccnd1*, quando comparados com mioblastos que não foram tratados com exossomos. A ciclina D1 exerce importante papel durante a proliferação celular, pois regula a passagem de núcleos interfásicos da fase G1 para a fase S¹⁴⁸. Panda, C. et al. (2016) analisaram a expressão desse gene durante a proliferação e diferenciação de células C2C12, e observaram que a ciclina D1 está regulada positivamente durante a proliferação celular, e sua expressão é diminuída com o início da diferenciação, sugerindo um comprometimento com a diferenciação celular e formação de miotubos¹⁴⁹. Também observamos um aumento da expressão de *MyoG* (miogenina), fator transcricional também pertencente à família dos MRF, e importante para diferenciação de mioblastos em fibras musculares¹⁵⁰. Sendo assim, os dados de expressão de ciclina D1 e *MyoG* sugerem que os exossomos, independente se provenientes de miotubos Exo-TNF α ou Exo-CT, inibem a proliferação celular de mioblastos C2C12 e, portanto, moléculas presentes nesses exossomos podem direcionar de mioblastos para o processo de fusão e diferenciação em miotubos. Em contra partida, estudos têm demonstrado que exossomos tem a capacidade de promover a proliferação celular, ao invés de inibi-la,^{151,152}. No entanto, exossomos podem ter distintos efeitos sobre as células receptoras, uma vez que sua ação dependerá do tipo de moléculas transportadas por eles^{70,153,154}. Nesse sentido, Aiello, (2017)¹⁵⁵ demonstraram que exossomos derivados de células T regulatórias tem a capacidade de suprimir a proliferação de células T. Nossos dados também sugerem que os exossomos tem importante papel na diferenciação de mioblastos em miotubos, independente do tratamento com TNF- α , uma vez que observamos aumento da expressão de miosina *Myh2* e *Tnnt1* em miotubos tratados com Exo-CT e Exo-TNF- α , quando comparados aos miotubos não tratados com exossomos. O aumento da expressão desses genes são preditivos do comprometimento celular com a diferenciação de mioblastos em miotubos¹⁵⁶.

Utilizando os mesmos exossomos (Exo-CT e Exo-TNF- α), pesquisamos a presença de 641 miRNAs, utilizando o sistema *Taqman Low Density Arrays*; desses, 44 miRNAs estão presentes nos exossomos, incluindo 6 miRNAs que apresentaram quantidades relativas distintas

no grupo Exo-TNF- α em relação ao Exo-CT (3 regulados positivamente: miR-365-3p, -146a-5p e -30b-5p; 3 regulados negativamente: miR-34c-3p, -214p-3p e -484). Posteriormente, buscamos possíveis transcritos alvos desses 6 miRNAs, a partir de dados de *microarrays* de células C2C12 durante a miogênese e na atrofia induzida por TNF- α (disponíveis em bancos de dados públicos). Após a reanálise desses dados de *microarrays*, utilizamos esses dados dos transcritos presentes em células C2C12 nessas condições para predição de alvos desses 6 miRNAs, a qual gerou uma lista com 47 potenciais alvos para esses miRNAs que alteram sua quantidade relativa nos exossomos após o tratamento com o TNF- α . Dentre esses alvos, destacaram-se os transcritos *Dapk2*, *St8sia4*, *Zeb1*, *Stat1* e *Psm10*, que são regulados negativamente em miotubos tratados com TNF- α com base na reanálise dos dados de *microarrays*, e que estão envolvidos em processos de migração celular¹⁵⁷⁻¹⁶¹. Foi demonstrado previamente que o *Dapk2* exerce papel essencial na migração de neutrófilos e eosinófilos, e que o seu bloqueio diminui drasticamente a mobilidade celular¹⁵⁷. Apesar do *Zeb1* também ser associado com processo de migração¹⁵⁹, ele não alterou sua expressão em nosso modelo experimental. Além disso, a análise de enriquecimento de vias dos dados de *microarrays* de células C2C12 indicou que, além das vias canônicas conhecidas por estarem alteradas no tratamento com TNF- α , o termo ontológico *positive regulation of cell migration (GO:0030335)* se mostrou enriquecido em miotubos tratados com TNF- α .

Esses dados estão de acordo com os nossos achados que demonstram um possível efeito de miRNAs enriquecidos em exossomos na migração celular, pois o aumento da expressão dos miRNAs miR-365-3p e -146a-5p foi concomitante com a diminuição da migração celular. E, já foi demonstrado previamente na literatura que o aumento da expressão do miR-365 inibe a capacidade proliferativa, de migração e invasão de células de glioma, por inibir a fosforilação do Akt e mTOR *in vitro* e *in vivo*¹⁶². Já o miR-146a-5p atua regulando negativamente a expressão dos genes *Igf2bp1* (insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1) e HuR (human antigen R). Também foi demonstrado que quando a expressão do miR-146a-5p é regulada negativamente, a capacidade de migração celular é parcialmente reestabelecida, e que a diminuição da expressão dos genes *Igf2bp1* e *Hur* compromete a capacidade de migração celular¹⁶³. Além disso, experimentos sugerem que o *Igf-1r* é alvo da família do miR-30b-5p e, quando a expressão de *Igf-1r* é regulada negativamente, ocorre a diminuição da proliferação e da invasibilidade celular^{164,165}.

Os miRNAs também possuem importante papel no controle da proliferação e diferenciação celular. O fator de transcrição Yin Yang 1 (Yy1) é uma proteína multifuncional

amplamente expressa que atua como repressor, ativador e iniciador da transcrição de inúmeros genes, inclusive atua no controle da proliferação e diferenciação celular¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Foi demonstrado por outros autores que a expressão elevada do miR-34c, o qual também estava desregulado em nosso experimento (Exo-TNF- α), inibe a proliferação de mioblastos por regular negativamente o *Yy1*¹⁶⁹. Neste mesmo sentido, outro grupo de pesquisa demonstrou que o mir-34c ativa a diferenciação por inibir a proliferação de células progenitoras *in vitro*¹⁷⁰. Também detectamos o miR-214 desregulado em Exo-TNF- α , o qual já foi descrito como um regulador negativo da proteína *Ezh2*, uma subunidade catalítica do complexo PcG¹⁷¹. As policombo (PcG) são importantes proteínas que se ligam a regiões promotoras impedindo a transcrição de diferentes fatores transcricionais (para revisão, ver Schuettengruber, B. et al.¹⁷²). Sendo assim, o aumento da expressão do miR-214 resulta na diminuição da atividade das PcG, levando a expressão de fatores transcricionais como a *Myod* e Miogenina e na ativação da diferenciação celular de células musculares¹⁷¹. Nesse mesmo sentido, Honardoost *et al.* (2015) também correlacionaram a diminuição da expressão do mir-214 com ativação da diferenciação muscular¹⁷³. Esses dados sugerem que, de fato, os miRNAs transportados por exossomos exercem um importante papel regulador, inclusive podendo ativar a motilidade celular e intensificar o processo de diferenciação. Certamente a motilidade celular se faz necessária uma vez que é fundamental que os mioblastos se fundam para formação dos miotubos.

A análise de RNAs transportados por exossomos (Exo-TNF α e Exo-CT) por meio de sequenciamento de nova geração nos permitiu identificar quais os transcritos são mais abundantes em exossomos provenientes do meio de cultura de miotubo C2C12. Dentre os RNAs mais abundantes, identificamos os RNAs ribossomais mitocondriais mt-Rnr1 e mt-Rnr2. Esses RNAs são conhecidos como RNAs ribossomais mitocondriais 12s e 16s, respectivamente, e ambos são codificados no genoma mitocondrial¹⁴³. Os ribossomos mitocondriais são formados basicamente por três moléculas de RNA, o RNAr 16S, RNAr 12S e o mt-tRNA, além de 80 proteínas, das quais 36 são específicas de mitocôndrias (para revisão, ver Amunts, A. et al., 2015¹⁷⁴). Esses RNAs são fundamentais para o funcionamento dos ribossomos pois constituem o arcabouço dos ribossomos, bem como constituem parte do seu sítio ativo para transcrição de RNAs¹⁷⁴. Além do seu papel notório na tradução de mRNAs, dados sugerem que os RNAs ribossomais mitocondriais (mt-rRNAs) exercem importante papel regulatório. Esses mt-rRNAs são regulados negativamente em câncer prostático, sugerindo um importante papel nessa doença¹⁷⁵. Também foi sugerido que o aumento da taxa de metilação no

sítio 932 do DNA mitocondrial 12s (mt-Rnr-1) durante o envelhecimento diminui a sobrevivência dos pacientes¹⁷⁶.

Além disso, não tão recentemente, porém ainda pouco explorado pela comunidade científica, foi demonstrado que os RNAs ribossomais 12S e 16S podem ser traduzidos em peptídeos biologicamente ativos. O primeiro peptídeo foi identificado em 2013, conhecido como humanin, o qual exerce um importante papel anti-apoptótico¹⁷⁷. Outros trabalhos também demonstraram a importância do humanin no controle das vias metabólicas envolvidas no gasto de energia^{178,179}. O humanin exerce efeito cardioprotetor contra lesões causadas por isquemia remota, uma vez que atuam diminuindo a disfunção mitocondrial cardíaca¹⁸⁰. Dados sugerem que os humanins também exercem um importante papel na musculatura esquelética, pois indivíduos submetidos a exercício aeróbico aumentaram sua expressão no músculo esquelético¹⁸¹.

A análise de sequenciamento de RNAs ancorados a ribossomos (técnica de *Ribosome Profiling*) disponível no banco de dados GWIPS-viz (<http://gwips.ucc.ie/>) demonstrou que regiões de RNAs ribossomais 12S e 16S são de fato traduzidas, inclusive em miofiblastos e miofibrilos. Essa mesma análise demonstrou que os genes de RNA ribossomais podem ser transcritos nos dois sentidos, *forward* e *reverse*, a partir do DNA mitocondrial. Sendo assim, distintos peptídeos podem ser formados a partir desses RNAs ribossomais. Esses peptídeos são chamados de Peptídeos Derivados de Mitocôndria - MDP (do inglês *mitochondrial-derived peptide*).

Além do humanin, outros peptídeos codificados nos genes ribossomais mitocondriais 12S e 16S já foram descritos. Dentre eles, temos o SHLP1, SHLP2, SHLP3, SHLP4, SHLP5 e SHLP6, codificados no 16S, e o MOTS-c, que é codificado no 12S^{182,183}. O SHLP2 e o SHLP3 parecem ter um importante papel na diferenciação celular e, inclusive, experimentos demonstraram que ambos aceleram a diferenciação celular em adipócitos na presença de insulina¹⁸³. Também foi demonstrado que o MOTS-c atua regulando a sensibilidade à insulina e a homeostase metabólica do corpo por ativar a via de sinalização AMPK, tendo como principal alvo o músculo esquelético¹⁸².

Inquestionavelmente os peptídeos mitocondriais são importantes elementos que atuam em diferentes funções, contudo, o mecanismo responsável pela síntese desses peptídeos ainda não está plenamente elucidado, e muitas questões por hora se mantêm sem respostas. De fato, Gidlund (2016)¹⁸¹ relataram um aumento da expressão de humanin no músculo esquelético após exercício físico, contudo, não identificaram seu aumento substancial na corrente

sanguínea, apesar dos MDPs terem sido reportados como moléculas transportadas pela corrente sanguínea ^{141,184}. Também foi demonstrado que humanin exerce importante papel cardioprotetor quando injetado em ratos submetidos a isquemia remota (IR), pois seu nível elevado no sangue age atenuando a disfunção mitocondrial e preservando parâmetros cardíacos, no entanto, ratos que não receberam injeção de humanin não tiveram efeitos cardioprotetores e, inclusive, os níveis séricos de humanin se mostraram reduzidos em ratos após IR ¹⁸⁰. Por outro lado, foi demonstrado experimentalmente que exossomos atuam como cardioprotetores após pré-condicionamento isquêmico, e que quando esses exossomos são removidos da circulação, o efeito cardioprotetor é perdido ¹⁸⁵. Apesar de humanin e exossomos exercerem papel cardioprotetor durante isquemia remota, até o momento, não se tem evidências de que ambos atuem em conjunto e, inclusive, estudos de proteômica de exossomos não evidenciaram a presença de MDPs no interior dessas vesículas ^{109,186,187}. Análise prévia de proteínas presentes em exossomos de plasma de camundongos após isquemia remota também não foi capaz de identificar sequências condizentes com MDPs ¹⁸⁸. No entanto, se os RNAs ribossomais transportados pelos exossomos pudessem ser reconhecidos e traduzidos em MDPs, teríamos um mecanismo que integraria a ação de MDPs e exossomos. Nesse sentido, já foi demonstrado que RNA transportado por exossomos podem ser reconhecidos e traduzidos em proteínas pelas células receptoras ⁹². Com base em nossos achados, e em dados da literatura, propomos que, além dos MDPs serem produzidos e terem seu efeito na própria célula que os produziu, os RNAs ribossomais mitocondriais podem ser compartimentalizados e transportados por meio de exossomos para as células alvos, onde são traduzidos em peptídeos biologicamente ativos. O mecanismo de como os mt-rRNAs poderiam ser transportados e traduzidos é esquematizado na **Figura 14**.

O mecanismo de formação de vesículas derivadas de mitocôndrias (MDVs) e o envolvimento do sistema endossomal no tráfego de vesículas ainda não foram completamente elucidados, porém, os princípios básicos já foram bem documentados na literatura (revisado por Sugiura, et al. (2014) ¹⁸⁹ e Lawson, et al. (2017) ¹⁹⁰). Nosso estudo é o primeiro relato de RNAs ribossomais mitocondriais transportados por exossomos, os quais possivelmente podem ser traduzidos em peptídeos pelas células receptoras.

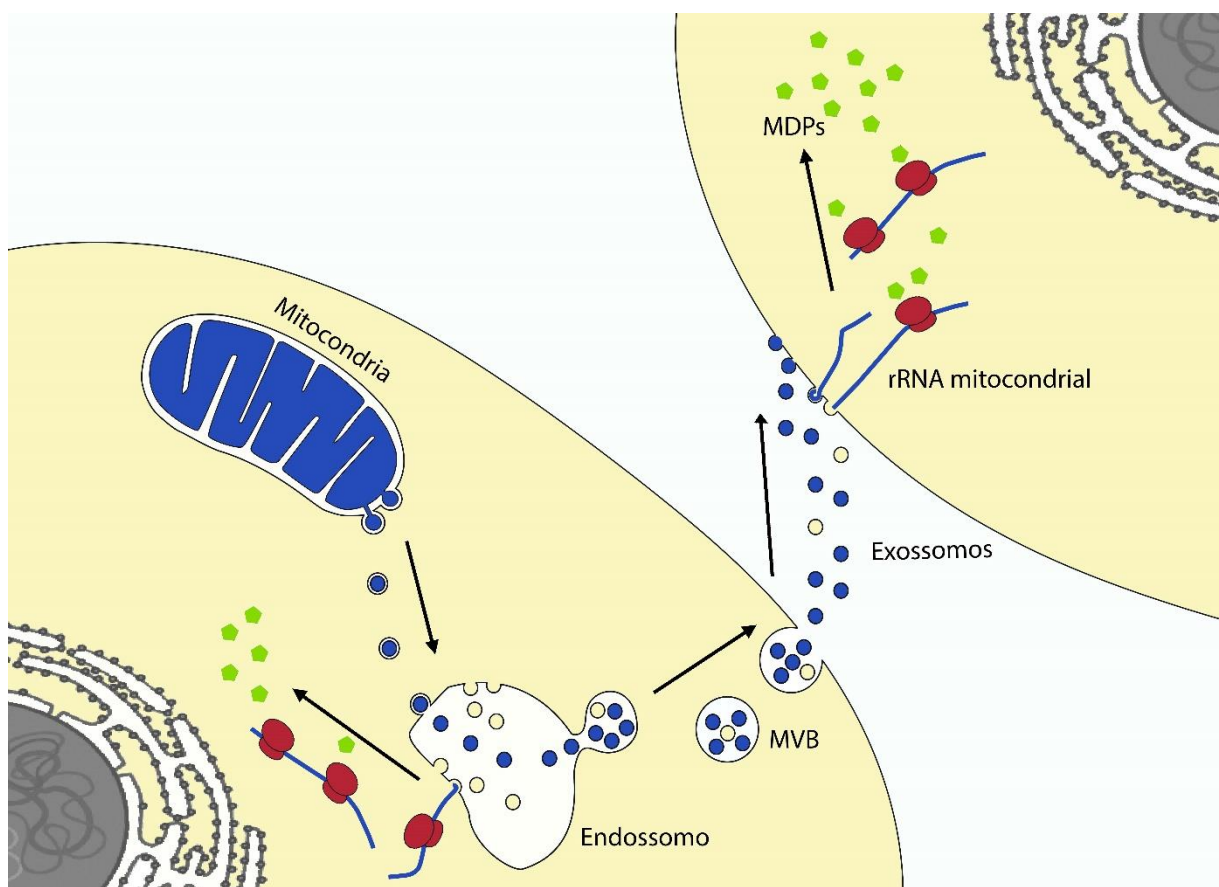


Figura 14. Possível mecanismo de transferência de RNA ribossomal mitocondrial para células-alvos por meio de exossomos. Vesículas são formadas a partir de dobramento da membrana interna e externa da mitocôndria, carregando moléculas da matriz mitocondrial, como por exemplo RNA ribossomal mitocondrial (mt-rRNA). Subsequente, essas vesículas, são direcionadas para o sistema endossomal, as quais são incorporadas e processadas. Em seguida, dois caminhos possíveis são aceitáveis: o primeiro, a carga proveniente da mitocôndria é liberada para o citoplasma celular para que o RNA ribossomal possa ser traduzido em MPDs (peptídeos mitocondriais derivados de RNA mitocondrial); no segundo caminho, as vesículas são compartimentalizadas em MVBs (corpos multivesiculares) que se fundem a membrana plasmática, liberando posteriormente para o meio extracelular suas vesículas (chamadas de exossomos). Os exossomos são transportadas até as células alvos e, uma vez reconhecidas e incorporadas pela célula alvo, o RNA ribossomal mitocondrial pode ser traduzido em MPDs.

6. Conclusão

Concluimos que o tratamento de miotubos com TNF- α altera a expressão de RNAs específicos no exossomos (miRNAs mmu-mir-365-3p, -146a-5p, -30b-5p, -34c-3p, -214-3p e -484 e os RNAs ribossomais mitocondriais 12S e 16S), os quais são capazes de alterar a expressão gênica, a migração/proliferação e diferenciação de células musculares C2C12 após 12h de tratamento.

7. Referências Bibliográficas

1. Zanou, N. & Gailly, P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 4117–30 (2013).
2. Giudice, J. & Taylor, J. M. ScienceDirect Muscle as a paracrine and endocrine organ. *Curr. Opin. Pharmacol.* **34**, 49–55 (2017).
3. Pette, D. & Staron, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc. Res. Tech.* **50**, 500–9 (2000).
4. Miyazaki, M. & Esser, K. a. Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. *J. Appl. Physiol.* **106**, 1367–73 (2009).
5. Rennie, M. J., Wackerhage, H., Spangenburg, E. E. & Booth, F. W. Control of the size of the human muscle mass. *Annu. Rev. Physiol.* **66**, 799–828 (2004).
6. Kandarian, S. C. & Jackman, R. W. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve* **33**, 155–65 (2006).
7. Lecker, S. H. *et al.* Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J.* **18**, 39–51 (2004).
8. Jackman, R. W. & Kandarian, S. C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, C834-43 (2004).
9. Glass, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 1974–84 (2005).
10. Fukushima, H. & Koga, F. Impact of sarcopenia in the management of urological cancer patients. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **17**, 455–466 (2017).
11. Loncar, G., Omersa, D., Cvetinovic, N., Arandjelovic, A. & Lainscak, M. Emerging biomarkers in heart failure and cardiac cachexia. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 23878–96 (2014).
12. Dogra, C. *et al.* TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a potent skeletal muscle-wasting cytokine. *FASEB J.* **21**, 1857–69 (2007).
13. Braun, T. & Gautel, M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 349–61 (2011).
14. Cao, P. R., Kim, H. J. & Lecker, S. H. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 2088–97 (2005).
15. Carvalho, R. F. *et al.* Heart failure increases atrogen-1 and MuRF1 gene expression in skeletal muscle with fiber type-specific atrophy. *J. Mol. Histol.* **41**, 81–7 (2010).

16. Acharyya, S. *et al.* Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. *Regulation* **114**, (2004).
17. Cai, D. *et al.* IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* **119**, 285–98 (2004).
18. Gomes, M. D., Lecker, S. H., Jagoe, R. T., Navon, A. & Goldberg, A. L. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 14440–5 (2001).
19. Tisdale, M. J. Biology of cachexia. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 1763–73 (1997).
20. Morley, J. E., Thomas, D. R. & Wilson, M.-M. G. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 735–43 (2006).
21. Tisdale, M. J. CACHEXIA IN CANCER PATIENTS. **2**, 862–871 (2002).
22. Evans, W. J. *et al.* Cachexia: a new definition. *Clin. Nutr.* **27**, 793–9 (2008).
23. Donohoe, C. L., Ryan, A. M. & Reynolds, J. V. Cancer cachexia: mechanisms and clinical implications. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2011**, 601434 (2011).
24. von Haehling, S., Stepney, R. & Anker, S. D. Advances in understanding and treating cardiac cachexia: highlights from the 5th Cachexia Conference. *Int. J. Cardiol.* **144**, 347–9 (2010).
25. Evans, W. K. *et al.* Limited impact of total parenteral nutrition on nutritional status during treatment for small cell lung cancer. *Cancer Res.* **45**, 3347–53 (1985).
26. Curtis, J. P. *et al.* The obesity paradox: body mass index and outcomes in patients with heart failure. *Arch. Intern. Med.* **165**, 55–61 (2005).
27. Tracey, K. J. & Cerami, A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 317–43 (1993).
28. Broussard, S. R. *et al.* IL-1beta impairs insulin-like growth factor i-induced differentiation and downstream activation signals of the insulin-like growth factor i receptor in myoblasts. *J. Immunol.* **172**, 7713–20 (2004).
29. Miller, S. C., Ito, H., Blau, H. M. & Torti, F. M. Tumor necrosis factor inhibits human myogenesis in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2295–301 (1988).
30. Langen, R. C., Schols, a M., Kelders, M. C., Wouters, E. F. & Janssen-Heininger, Y. M. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. *FASEB J.* **15**, 1169–80 (2001).
31. Li, Y. P., Schwartz, R. J., Waddell, I. D., Holloway, B. R. & Reid, M. B. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB

- activation in response to tumor necrosis factor alpha. *FASEB J.* **12**, 871–80 (1998).
32. Li, Y. P. & Reid, M. B. NF-kappaB mediates the protein loss induced by TNF-alpha in differentiated skeletal muscle myotubes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **279**, R1165-70 (2000).
 33. Reid, M. B. & Li, Y. P. Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir. Res.* **2**, 269–72 (2001).
 34. Haddad, F., Zaldivar, F., Cooper, D. M. & Adams, G. R. IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *J. Appl. Physiol.* **98**, 911–7 (2005).
 35. Srivastava, A. K. *et al.* Tumor Necrosis Factor- Augments Matrix Metalloproteinase-9 Production in Skeletal Muscle Cells through the Activation of Transforming Growth Factor- activated Kinase 1 (TAK1)-dependent Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* **282**, 35113–35124 (2007).
 36. Drexler, A. M. Tumor necrosis factor: its role in HIV/AIDS. *STEP Perspect.* **7**, 13–5 (1995).
 37. Spooner, C. E., Markowitz, N. P. & Saravolatz, L. D. The role of tumor necrosis factor in sepsis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **62**, S11-7 (1992).
 38. Moller, D. E. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol. Metab.* **11**, 212–7 (2000).
 39. Anker, S. D. & Rauchhaus, M. Insights into the pathogenesis of chronic heart failure: immune activation and cachexia. *Curr. Opin. Cardiol.* **14**, 211–6 (1999).
 40. Farber, M. O. & Mannix, E. T. Tissue wasting in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Neurol. Clin.* **18**, 245–62 (2000).
 41. Tisdale, M. J. Wasting in cancer. *J. Nutr.* **129**, 243S–246S (1999).
 42. Popa, C., Netea, M. G., van Riel, P. L. C. M., van der Meer, J. W. M. & Stalenhoef, A. F. H. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J. Lipid Res.* **48**, 751–62 (2007).
 43. Spriggs, D. R., Deutsch, S. & Kufe, D. W. Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. *Immunol. Ser.* **56**, 3–34 (1992).
 44. Peterson, J. M., Bakkar, N. & Guttridge, D. C. NF-κB signaling in skeletal muscle health and disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* **96**, 85–119 (2011).
 45. Baeuerle, P. A. & Baltimore, D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* **242**, 540–6 (1988).
 46. Yaron, A. *et al.* Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin

- ligase. *Nature* **396**, 590–4 (1998).
47. Israël, a. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol.* **10**, 129–33 (2000).
 48. Guttridge, D. C. NF-kappa B-Induced Loss of MyoD Messenger RNA: Possible Role in Muscle Decay and Cachexia. *Science (80-.)*. **289**, 2363–2366 (2000).
 49. Murre, C. *et al.* Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* **58**, 537–44 (1989).
 50. Güller, I. & Russell, A. P. MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function. *J. Physiol.* **588**, 4075–4087 (2010).
 51. Ambros, V. *et al.* A uniform system for microRNA annotation. 277–279 (2003). doi:10.1261/rna.2183803.One
 52. Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* **19**, 92–105 (2009).
 53. Vasudevan, S. & Steitz, J. A. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* **128**, 1105–18 (2007).
 54. Chen, J. *et al.* The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* **38**, 228–33 (2006).
 55. 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).
 56. Naguibneva, I. *et al.* The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. **8**, (2006).
 57. Sayed, D., Hong, C., Chen, I., Lypowy, J. & Abdellatif, M. MicroRNAs Play an Essential Role in the Development of Cardiac Hypertrophy. (2007). doi:10.1161/01.RES.0000257913.42552.23
 58. van Rooij, E. *et al.* Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* **316**, 575–9 (2007).
 59. McCarthy, J. J., Esser, K. a & Andrade, F. H. MicroRNA-206 is overexpressed in the diaphragm but not the hindlimb muscle of mdx mouse. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **293**, C451-7 (2007).
 60. 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. **39**, 259–263 (2007).
 61. van Rooij, E., Liu, N. & Olson, E. N. MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet.* **24**, 159–66 (2008).

62. Callis, T. E., Deng, Z., Chen, J.-F. & Wang, D.-Z. Muscling through the microRNA world. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **233**, 131–8 (2008).
63. 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).
64. Greco, S. *et al.* Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *FASEB J.* **23**, 3335–46 (2009).
65. McCarthy, J. J. & Esser, K. A. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. 306–313 (2008).
doi:10.1152/jappphysiol.00932.2006
66. Eisenberg, I. *et al.* Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 17016–17021 (2007).
67. McCarthy, J. J., Esser, K. a, Peterson, C. a & Dupont-Versteegden, E. E. Evidence of MyomiR network regulation of beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy. *Physiol. Genomics* **39**, 219–26 (2009).
68. Soares, R. J. *et al.* Involvement of microRNAs in the regulation of muscle wasting during catabolic conditions. *J. Biol. Chem.* **289**, 21909–25 (2014).
69. Javeed, N. & Mukhopadhyay, D. Exosomes and their role in the micro-/macro-environment: a comprehensive review. *J. Biomed. Res.* **30**, (2016).
70. Kosaka, N. *et al.* Trash or Treasure: extracellular microRNAs and cell-to-cell communication. *Front. Genet.* **4**, 173 (2013).
71. Aoi, W. & Sakuma, K. Does regulation of skeletal muscle function involve circulating microRNAs? *Front. Physiol.* **5**, 39 (2014).
72. Piccin, A., Murphy, W. G. & Smith, O. P. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* **21**, 157–71 (2007).
73. Vader, P., Breakefield, X. O. & Wood, M. J. A. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends Mol. Med.* 1–9 (2014). doi:10.1016/j.molmed.2014.03.002
74. Diamant, M., Tushuizen, M. E., Sturk, A. & Nieuwland, R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur. J. Clin. Invest.* **34**, 392–401 (2004).
75. Zhang, H.-G. & Grizzle, W. E. Exosomes: a novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions. *Am. J. Pathol.* **184**, 28–41 (2014).
76. Raposo, G. *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **183**,

- 1161–72 (1996).
77. Lee, T. H. *et al.* Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer--the emerging science of cellular ‘debris’. *Semin. Immunopathol.* **33**, 455–67 (2011).
 78. Booth, A. M. *et al.* Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J. Cell Biol.* **172**, 923–35 (2006).
 79. Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **200**, 373–83 (2013).
 80. Camussi, G., Deregibus, M. C., Bruno, S., Cantaluppi, V. & Biancone, L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int.* **78**, 838–48 (2010).
 81. Majka, M. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34+ cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* **97**, 3075–3085 (2001).
 82. Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P. & Gerdes, H.-H. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* **303**, 1007–10 (2004).
 83. Sherer, N. M. & Mothes, W. Cytonemes and tunneling nanotubules in cell-cell communication and viral pathogenesis. *Trends Cell Biol.* **18**, 414–20 (2008).
 84. Camussi, G. *et al.* Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Am. J. Cancer Res.* **1**, 98–110 (2011).
 85. Barry, O. P., Pratico, D., Lawson, J. a & FitzGerald, G. a. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J. Clin. Invest.* **99**, 2118–27 (1997).
 86. Fackler, O. T. & Peterlin, B. M. Endocytic entry of HIV-1. *Curr. Biol.* **10**, 1005–8 (2000).
 87. Fevrier, B. *et al.* Cells release prions in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9683–8 (2004).
 88. Bang, C. *et al.* Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J. Clin. Invest.* **124**, 2136–46 (2014).
 89. Baj-Krzyworzeka, M. *et al.* Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* **55**, 808–18 (2006).
 90. Ratajczak, J. *et al.* Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein

- delivery. *Leukemia* **20**, 847–56 (2006).
91. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654–9 (2007).
 92. Deregibus, M. C. *et al.* Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* **110**, 2440–8 (2007).
 93. Collino, F. *et al.* Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One* **5**, e11803 (2010).
 94. Yuan, A. *et al.* Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLoS One* **4**, e4722 (2009).
 95. Lynch, S. F. & Ludlam, C. a. Plasma microparticles and vascular disorders. *Br. J. Haematol.* **137**, 36–48 (2007).
 96. Inal, J. M. *et al.* Blood/plasma secretome and microvesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1834**, 2317–25 (2013).
 97. Coleman, M. L. *et al.* Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* **3**, 339–45 (2001).
 98. Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S. & Chen, C. C. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neurooncol.* **113**, 1–11 (2013).
 99. SOTELO, J. R. & PORTER, K. R. An electron microscope study of the rat ovum. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **5**, 327–42 (1959).
 100. Pols, M. S. & Klumperman, J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp. Cell Res.* **315**, 1584–92 (2009).
 101. Wollert, T. & Hurley, J. H. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* **464**, 864–9 (2010).
 102. Hurley, J. H. & Hanson, P. I. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 556–66 (2010).
 103. Babst, M. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 452–7 (2011).
 104. McCullough, J., Fisher, R. D., Whitby, F. G., Sundquist, W. I. & Hill, C. P. ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7687–91 (2008).

105. Waldenström, A. & Ronquist, G. Role of exosomes in myocardial remodeling. *Circ. Res.* **114**, 315–24 (2014).
106. Sahoo, S. & Losordo, D. W. Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction. *Circ. Res.* **114**, 333–44 (2014).
107. Ailawadi, S., Wang, X., Gu, H. & Fan, G.-C. Pathologic function and therapeutic potential of exosomes in cardiovascular disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1852**, 1–11 (2014).
108. Murach, K. A. & McCarthy, J. J. MicroRNAs, heart failure, and aging: potential interactions with skeletal muscle. *Heart Fail. Rev.* **22**, 209–218 (2017).
109. Forterre, A. *et al.* Proteomic analysis of C2C12 myoblast and myotube exosome-like vesicles: a new paradigm for myoblast-myotube cross talk? *PLoS One* **9**, e84153 (2014).
110. Aswad, H. *et al.* Exosomes participate in the alteration of muscle homeostasis during lipid-induced insulin resistance in mice. *Diabetologia* (2014). doi:10.1007/s00125-014-3337-2
111. He, W. a *et al.* Microvesicles containing miRNAs promote muscle cell death in cancer cachexia via TLR7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, (2014).
112. Forterre, A. *et al.* Myotube-derived exosomal miRNAs downregulate Sirtuin1 in myoblasts during muscle cell differentiation. *Cell Cycle* **13**, 78–89 (2014).
113. Hudson, M. B. *et al.* miR-23a is decreased during muscle atrophy by a mechanism that includes calcineurin signaling and exosome-mediated export. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **306**, C551-8 (2014).
114. 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).
115. Qin, Y. *et al.* Myostatin Inhibits Osteoblastic Differentiation by Suppressing Osteocyte-derived Exosomal microRNA-218: A Novel Mechanism in Muscle-Bone Communication. *J. Biol. Chem.* (2017). doi:10.1074/jbc.M116.770941
116. Sharma, M., Juvvuna, P. K., Kukreti, H. & McFarlane, C. Mega roles of microRNAs in regulation of skeletal muscle health and disease. *Front. Physiol.* **5**, 239 (2014).
117. 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).
118. Srivastava, S., Gala, H. P., Mishra, R. K. & Dhawan, J. Distinguishing States of Arrest:

- Genome-Wide Descriptions of Cellular Quiescence Using ChIP-Seq and RNA-Seq Analysis. *Methods Mol. Biol.* **1686**, 215–239 (2018).
119. Sun, K., Zhou, L., Zhao, Y., Wang, H. & Sun, H. Genome-wide RNA-seq and ChIP-seq reveal Linc-YY1 function in regulating YY1/PRC2 activity during skeletal myogenesis. *Genomics data* **7**, 247–9 (2016).
 120. Benhaddou, A. *et al.* Transcription factor TEAD4 regulates expression of myogenin and the unfolded protein response genes during C2C12 cell differentiation. *Cell Death Differ.* **19**, 220–31 (2012).
 121. Guo, Y. *et al.* Identification of MyoD-Responsive Transcripts Reveals a Novel Long Non-coding RNA (lncRNA-AK143003) that Negatively Regulates Myoblast Differentiation. *Sci. Rep.* **7**, 2828 (2017).
 122. Lässer, C., Eldh, M. & Lötval, J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J. Vis. Exp.* e3037 (2012). doi:10.3791/3037
 123. Rodriguez, L. G., Wu, X. & Guan, J.-L. Wound-healing assay. *Methods Mol. Biol.* **294**, 23–9 (2005).
 124. Bustin, S. a *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–22 (2009).
 125. Fleige, S. & Pfaffl, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol. Aspects Med.* **27**, 126–39 (2006).
 126. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–8 (2001).
 127. Kim, D. *et al.* TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **14**, R36 (2013).
 128. Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166–169 (2015).
 129. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
 130. Meyer, S. U. *et al.* Tumor Necrosis Factor Alpha and Insulin-Like Growth Factor 1 Induced Modifications of the Gene Expression Kinetics of Differentiating Skeletal Muscle Cells. *PLoS One* **10**, e0139520 (2015).
 131. Kolesnikov, N. *et al.* ArrayExpress update--simplifying data submissions. *Nucleic Acids Res.* **43**, D1113-6 (2015).

132. Tomczak, K. K. *et al.* Expression profiling and identification of novel genes involved in myogenic differentiation. *FASEB J.* **18**, 403–5 (2004).
133. Barrett, T. *et al.* NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res.* **41**, D991-5 (2013).
134. Smyth, G. K. Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* **3**, 1–25 (2004).
135. Dweep, H. & Gretz, N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat. Methods* **12**, 697–697 (2015).
136. Chou, C.-H. *et al.* miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res.* **44**, D239–D247 (2016).
137. Kim, D.-K. *et al.* EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics* **31**, 933–9 (2015).
138. Murphy, C. *et al.* Emerging role of extracellular vesicles in musculoskeletal diseases. *Mol. Aspects Med.* (2017). doi:10.1016/j.mam.2017.09.006
139. Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M. J., Pagano, M. & Draetta, G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* **7**, 812–21 (1993).
140. D’haene, B., Mestdagh, P., Hellemans, J. & Vandesompele, J. miRNA expression profiling: from reference genes to global mean normalization. *Methods Mol. Biol.* **822**, 261–72 (2012).
141. Kim, S.-J., Xiao, J., Wan, J., Cohen, P. & Yen, K. Mitochondrially derived peptides as novel regulators of metabolism. *J. Physiol.* (2017). doi:10.1113/JP274472
142. Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. S. & Weissman, J. S. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* **324**, 218–23 (2009).
143. Andrews, R. M. *et al.* Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* **23**, 147 (1999).
144. Chandran, R., Knobloch, T. J., Anghelina, M. & Agarwal, S. Biomechanical signals upregulate myogenic gene induction in the presence or absence of inflammation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **293**, C267-76 (2007).
145. Biedasek, K. *et al.* Skeletal muscle 11beta-HSD1 controls glucocorticoid-induced proteolysis and expression of E3 ubiquitin ligases atrogenin-1 and MuRF-1. *PLoS One* **6**, e16674 (2011).
146. Mu, W., Rana, S. & Zöller, M. Host matrix modulation by tumor exosomes promotes

- motility and invasiveness. *Neoplasia* **15**, 875–87 (2013).
147. Sung, B. H., Ketova, T., Hoshino, D., Zijlstra, A. & Weaver, A. M. Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion. *Nat. Commun.* **6**, 7164 (2015).
 148. John, R. R., Malathi, N., Ravindran, C. & Anandan, S. Mini review: Multifaceted role played by cyclin D1 in tumor behavior. *Indian J. Dent. Res.* **28**, 187–192
 149. Panda, A. C. *et al.* Novel RNA-binding activity of MYF5 enhances Ccnd1/Cyclin D1 mRNA translation during myogenesis. *Nucleic Acids Res.* **44**, 2393–408 (2016).
 150. Buckingham, M. *et al.* The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J. Anat.* **202**, 59–68 (2003).
 151. Ke, X. *et al.* Human Endothelial Progenitor Cell-Derived Exosomes Increase Proliferation and Angiogenesis in Cardiac Fibroblasts by Promoting the Mesenchymal-Endothelial Transition and Reducing High Mobility Group Box 1 Protein B1 Expression. *DNA Cell Biol.* (2017).
 152. Choi, E. W. *et al.* Exosomes from human adipose derived stem cells promote proliferation and migration of skin fibroblasts. *Exp. Dermatol.* (2017).
doi:10.1111/exd.13451
 153. Willms, E. *et al.* Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci. Rep.* **6**, 22519 (2016).
 154. Huang-Doran, I., Zhang, C.-Y. & Vidal-Puig, A. Extracellular Vesicles: Novel Mediators of Cell Communication In Metabolic Disease. *Trends Endocrinol. Metab.* **28**, 3–18 (2017).
 155. Aiello, S. *et al.* Extracellular vesicles derived from T regulatory cells suppress T cell proliferation and prolong allograft survival. *Sci. Rep.* **7**, 11518 (2017).
 156. Olson, E. N. Regulation of muscle transcription by the MyoD family. The heart of the matter. *Circ. Res.* **72**, 1–6 (1993).
 157. Geering, B. *et al.* DAPK2 positively regulates motility of neutrophils and eosinophils in response to intermediary chemoattractants. *J. Leukoc. Biol.* **95**, 293–303 (2014).
 158. Kröcher, T. *et al.* A crucial role for polysialic acid in developmental interneuron migration and the establishment of interneuron densities in the mouse prefrontal cortex. *Development* **141**, 3022–32 (2014).
 159. Zou, Q. *et al.* A TP73-AS1/miR-200a/ZEB1 regulating loop promotes breast cancer cell invasion and migration. *J. Cell. Biochem.* **119**, 2189–2199 (2018).

160. Jere, S. W., Houreld, N. N. & Abrahamse, H. Photobiomodulation at 660nm stimulates proliferation and migration of diabetic wounded cells via the expression of epidermal growth factor and the JAK/STAT pathway. *J. Photochem. Photobiol. B.* **179**, 74–83 (2018).
161. Chu, Y. M. *et al.* MicroRNA-1254 inhibits the migration of colon adenocarcinoma cells by targeting PSMD10. *J. Dig. Dis.* **18**, 169–178 (2017).
162. Zhu, Y., Zhao, H., Rao, M. & Xu, S. MicroRNA-365 inhibits proliferation, migration and invasion of glioma by targeting PIK3R3. *Oncol. Rep.* **37**, 2185–2192 (2017).
163. Nguyen, M.-A. *et al.* Extracellular Vesicles Secreted by Atherogenic Macrophages Transfer MicroRNA to Inhibit Cell Migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2017). doi:10.1161/ATVBAHA.117.309795
164. Qin, X., Chen, J., Wu, L. & Liu, Z. MiR-30b-5p acts as a tumor suppressor, repressing cell proliferation and cell cycle in human hepatocellular carcinoma. *Biomed. Pharmacother.* **89**, 742–750 (2017).
165. Liu, Y., Zhou, Y., Gong, X. & Zhang, C. MicroRNA-30a-5p inhibits the proliferation and invasion of gastric cancer cells by targeting insulin-like growth factor 1 receptor. *Exp. Ther. Med.* **14**, 173–180 (2017).
166. Atchison, M., Basu, A., Zaprazna, K. & Papasani, M. Mechanisms of Yin Yang 1 in oncogenesis: the importance of indirect effects. *Crit. Rev. Oncog.* **16**, 143–61 (2011).
167. Zhang, Q., Stovall, D. B., Inoue, K. & Sui, G. The oncogenic role of Yin Yang 1. *Crit. Rev. Oncog.* **16**, 163–97 (2011).
168. Nicholson, S., Whitehouse, H., Naidoo, K. & Byers, R. J. Yin Yang 1 in human cancer. *Crit. Rev. Oncog.* **16**, 245–60 (2011).
169. Wang, M. *et al.* miRNA-34c inhibits myoblasts proliferation by targeting YY1. *Cell Cycle* **16**, 1661–1672 (2017).
170. Hou, L. *et al.* MiR-34c represses muscle development by forming a regulatory loop with Notch1. *Sci. Rep.* **7**, 9346 (2017).
171. Juan, A. H., Kumar, R. M., Marx, J. G., Young, R. A. & Sartorelli, V. Mir-214-dependent regulation of the polycomb protein Ezh2 in skeletal muscle and embryonic stem cells. *Mol. Cell* **36**, 61–74 (2009).
172. Schuettengruber, B., Bourbon, H.-M., Di Croce, L. & Cavalli, G. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell* **171**, 34–57 (2017).
173. Honardoost, M., Soleimani, M., Arefian, E. & Sarookhani, M. R. Expression Change

- of miR-214 and miR-135 during Muscle Differentiation. *Cell J.* **17**, 461–70 (2015).
174. Amunts, A., Brown, A., Toots, J., Scheres, S. H. W. & Ramakrishnan, V. Ribosome. The structure of the human mitochondrial ribosome. *Science* **348**, 95–98 (2015).
 175. Abril, J. *et al.* Altered expression of 12S/MT-RNR1, MT-CO2/COX2, and MT-ATP6 mitochondrial genes in prostate cancer. *Prostate* **68**, 1086–96 (2008).
 176. D’Aquila, P. *et al.* Age-and gender-related pattern of methylation in the MT-RNR1 gene. *Epigenomics* **7**, 707–16 (2015).
 177. Guo, B. *et al.* Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature* **423**, 456–61 (2003).
 178. Kuliawat, R. *et al.* Potent humanin analog increases glucose-stimulated insulin secretion through enhanced metabolism in the β cell. *FASEB J.* **27**, 4890–8 (2013).
 179. Ikonen, M. *et al.* Interaction between the Alzheimer’s survival peptide humanin and insulin-like growth factor-binding protein 3 regulates cell survival and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13042–7 (2003).
 180. Thummasorn, S. *et al.* Humanin exerts cardioprotection against cardiac ischemia/reperfusion injury through attenuation of mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc. Ther.* **34**, 404–414 (2016).
 181. Gidlund, E.-K. *et al.* Humanin skeletal muscle protein levels increase after resistance training in men with impaired glucose metabolism. *Physiol. Rep.* **4**, (2016).
 182. Lee, C. *et al.* The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. *Cell Metab.* **21**, 443–54 (2015).
 183. Cobb, L. J. *et al.* Naturally occurring mitochondrial-derived peptides are age-dependent regulators of apoptosis, insulin sensitivity, and inflammatory markers. *Aging (Albany, NY).* **8**, 796–809 (2016).
 184. Lee, C., Yen, K. & Cohen, P. Humanin: a harbinger of mitochondrial-derived peptides? *Trends Endocrinol. Metab.* **24**, 222–228 (2013).
 185. Giricz, Z. *et al.* Cardioprotection by remote ischemic preconditioning of the rat heart is mediated by extracellular vesicles. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **68**, 75–8 (2014).
 186. Kennel, P. J. *et al.* Serum exosomal protein profiling for the non-invasive detection of cardiac allograft rejection. *J. Heart Lung Transplant.* (2017).
doi:10.1016/j.healun.2017.07.012
 187. Cosme, J., Liu, P. P. & Gramolini, A. O. The cardiovascular exosome: current perspectives and potential. *Proteomics* **13**, 1654–9 (2013).

188. Yang, J. C.-S. *et al.* Altered exosomal protein expression in the serum of NF- κ B knockout mice following skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *J. Biomed. Sci.* **22**, 40 (2015).
189. Lawson, C., Kovacs, D., Finding, E., Ulfelder, E. & Luis-Fuentes, V. Extracellular Vesicles: Evolutionarily Conserved Mediators of Intercellular Communication. *Yale J. Biol. Med.* **90**, 481–491 (2017).
190. Sugiura, A., McLelland, G.-L., Fon, E. A. & McBride, H. M. A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO J.* **33**, 2142–56 (2014).

8. Material Suplementar

Tabela Suplementar 1 – miRNAs expressos em exossomos de miotubos tratados com TNF- α

Target Name	Ct Exo-CT		Ct Exo-TNF		
	Mean	\pm SEM	Mean	\pm SEM	
mmu-miR-1937b-241023_mat	13.35	\pm 1.0	13.20	\pm 1.6	0.15
mmu-miR-1937c-241011_mat	14.51	\pm 1.0	15.22	\pm 0.9	-0.71
mmu-miR-2134-241120_mat	16.84	\pm 0.7	16.67	\pm 0.9	0.16
mmu-miR-2138-241080_mat	19.65	\pm 0.9	19.45	\pm 2.6	0.20
mmu-miR-720-001629	21.40	\pm 1.1	21.24	\pm 1.9	0.16
hsa-miR-206-000510	20.24	\pm 0.9	21.47	\pm 2.9	-1.23
mmu-miR-34b-3p-4395748	26.61	\pm 3.5	22.33	\pm 0.9	4.27
mmu-miR-1274a-121150_mat	22.83	\pm 1.4	23.07	\pm 1.0	-0.24
mmu-miR-133a-4395357	26.22	\pm 3.3	23.29	\pm 2.6	2.92
mmu-miR-145-4395389	26.09	\pm 2.8	23.47	\pm 1.9	2.62
hsa-miR-214-000517	23.67	\pm 0.2	24.05	\pm 1.4	-0.38
mmu-miR-191-4395410	26.58	\pm 2.7	24.14	\pm 1.9	2.44
mmu-miR-30c-4373060	28.14	\pm 4.2	24.27	\pm 3.3	3.87
mmu-miR-214-4395417	25.13	\pm 0.7	24.45	\pm 1.7	0.68
mmu-miR-31-4373331	26.63	\pm 2.3	24.57	\pm 2.8	2.06
mmu-miR-30b-4373290	28.48	\pm 3.4	24.67	\pm 3.1	3.81
mmu-miR-199a-3p-4395415	28.50	\pm 3.4	25.07	\pm 2.9	3.43
mmu-miR-484-4381032	26.08	\pm 2.5	25.53	\pm 3.1	0.54
mmu-miR-574-3p-4395460	27.32	\pm 3.6	25.56	\pm 1.6	1.76
mmu-miR-16-4373121	29.13	\pm 1.9	25.60	\pm 3.9	3.53
mmu-miR-146a-4373132	30.47	\pm 2.9	25.60	\pm 2.7	4.87
mmu-miR-19b-4373098	29.38	\pm 2.4	25.71	\pm 4.0	3.67
mmu-miR-685-4386748	27.02	\pm 1.7	25.71	\pm 0.7	1.31
mmu-miR-365-4373194	31.06	\pm 3.4	25.82	\pm 2.1	5.24
hsa-miR-223-000526	25.61	\pm 0.3	25.86	\pm 3.7	-0.24
mmu-miR-2146-241082_mat	25.36	\pm 0.2	25.90	\pm 2.5	-0.54
mmu-miR-193b-4395597	28.86	\pm 3.8	25.99	\pm 1.5	2.87
mmu-let-7c-4373167	28.89	\pm 2.3	26.05	\pm 1.8	2.84
mmu-miR-222-4395387	28.34	\pm 2.5	26.05	\pm 2.4	2.28
mmu-miR-106a-4395589	29.86	\pm 2.7	26.06	\pm 3.1	3.81
mmu-miR-125a-5p-4395309	29.11	\pm 5.6	26.16	\pm 2.8	2.94
mmu-miR-29a-4395223	29.17	\pm 3.3	26.22	\pm 4.7	2.96
hsa-miR-30a-3p-000416	26.76	\pm 0.8	26.32	\pm 2.2	0.44

Target Name	Ct Exo-CT		Ct Exo-TNF		
	Mean	± SEM	Mean	± SEM	
hsa-miR-149-002255	26.65	± 2.2	26.43	± 2.7	0.22
mmu-miR-125b-5p-4373148	30.74	± 3.1	26.57	± 3.2	4.17
mmu-miR-34c#-002584	24.03	± 0.5	26.59	± 1.5	-2.55
hsa-miR-30e-3p-000422	26.72	± 0.6	26.65	± 2.4	0.06
hsa-miR-196a-241070_mat	25.99	± 0.0	26.76	± 2.8	-0.77
mmu-miR-146b-4373178	29.40	± 2.4	26.77	± 4.0	2.63
mmu-miR-331-3p-4373046	30.67	± 2.9	27.03	± 3.4	3.64
mmu-miR-532-5p-4380928	29.49	± 2.1	27.94	± 4.2	1.55
mmu-miR-143-4395360	30.28	± 1.2	27.95	± 4.0	2.33
mmu-miR-218-4373081	30.56	± 2.3	27.97	± 3.7	2.58
mmu-miR-2182-241119_mat	26.95	± 1.0	28.12	± 4.9	-1.17

Tabela Suplementar 02 – Transcritos identificados em exossomos de miotubos tratados com TNF- α

Gene Name	Gene ID	n Reads		
		EXO-CT	EXO-TNF	Δ Reads (log2)
Gm15662	ENSMUSG00000089855	241	434	0.85
Rpph1	ENSMUSG00000092837	92	132	0.52
Mir6236	ENSMUSG00000098973	156	130	0.26
mt-Rnr2	ENSMUSG00000064339	1376	107	3.68
Rny3	ENSMUSG00000064945	26	96	1.88
Rn7sk	ENSMUSG00000065037	42	78	0.89
Rny1	ENSMUSG00000065701	12	72	2.58
Rpl3	ENSMUSG00000088025	49	72	0.56
Eef1a1	ENSMUSG00000037742	11	49	2.16
mt-Rnr1	ENSMUSG00000064337	522	34	3.94
Fth1	ENSMUSG00000024661	1	21	4.39
Ncl	ENSMUSG00000026234	8	18	1.17
Rmrp	ENSMUSG00000088088	4	17	2.09
Ftl1	ENSMUSG00000050708	1	15	3.91
Rplp1	ENSMUSG00000007892	6	14	1.22
Cyb5r3	ENSMUSG00000018042	7	13	0.89
Rpl8	ENSMUSG00000003970	1	12	3.58
Gm26809	ENSMUSG00000097815	5	12	1.26
Rps19	ENSMUSG00000040952	2	11	2.46
Rps24	ENSMUSG00000025290	4	11	1.46
Rps15	ENSMUSG00000063457	1	10	3.32
Rnu11	ENSMUSG00000077323	1	10	3.32
Fn1	ENSMUSG00000026193	2	10	2.32
Des	ENSMUSG00000026208	4	10	1.32
Rpl41	ENSMUSG00000093674	1	9	3.17
Map4k4	ENSMUSG00000026074	3	9	1.58
Malat1	ENSMUSG00000092341	3	9	1.58
Vim	ENSMUSG00000026728	1	8	3.00
Mt1	ENSMUSG00000031765	1	8	3.00
Net1	ENSMUSG00000021215	3	8	1.42
Mdm2	ENSMUSG00000020184	4	8	1.00
Gm24407	ENSMUSG00000094377	4	8	1.00
Myh9	ENSMUSG00000022443	1	7	2.81
Eif3a	ENSMUSG00000024991	1	7	2.81
Gm15500	ENSMUSG00000086583	1	7	2.81
Ahnak	ENSMUSG00000069833	3	7	1.22
Actb	ENSMUSG00000029580	1	6	2.58
Pabpc1	ENSMUSG00000022283	3	6	1.00

Gene Name	Gene ID	n Reads		
		EXO-CT	EXO-TNF	Δ Reads (log2)
Hsp90ab1	ENSMUSG00000023944	4	6	0.58
Gm24265	ENSMUSG00000096243	4	6	0.58
Calr	ENSMUSG00000003814	5	6	0.26
Rpl7	ENSMUSG00000043716	1	5	2.32
Rps16-ps2	ENSMUSG00000060419	1	5	2.32
Chd4	ENSMUSG00000063870	1	5	2.32
Ifit3	ENSMUSG00000074896	1	5	2.32
Rpl3-ps1	ENSMUSG00000084349	1	5	2.32
Junb	ENSMUSG00000052837	5	5	0.00
Ptger1	ENSMUSG00000019464	1	4	2.00
Samd4	ENSMUSG00000021838	1	4	2.00
Rps14	ENSMUSG00000024608	1	4	2.00
Cald1	ENSMUSG00000029761	1	4	2.00
Copg1	ENSMUSG00000030058	1	4	2.00
Mrpl51	ENSMUSG00000030335	1	4	2.00
mt-Co1	ENSMUSG00000064351	9	4	1.17
Rplp0	ENSMUSG00000067274	7	4	0.81
Eif4g2	ENSMUSG00000005610	5	4	0.32
Eif3d	ENSMUSG00000016554	1	3	1.58
Taok1	ENSMUSG00000017291	1	3	1.58
Apbb2	ENSMUSG00000029207	1	3	1.58
Acta1	ENSMUSG00000031972	1	3	1.58
Nfe2l1	ENSMUSG00000038615	1	3	1.58
Rps18-ps3	ENSMUSG00000057657	1	3	1.58
Eif4b	ENSMUSG00000058655	1	3	1.58
Rack1	ENSMUSG00000020372	2	3	0.58
Zeb1	ENSMUSG00000024238	2	3	0.58
H3f3b	ENSMUSG00000016559	4	2	1.00
Rtcb	ENSMUSG00000001783	1	2	1.00
Rac1	ENSMUSG00000001847	1	2	1.00
Csf1	ENSMUSG00000014599	1	2	1.00
Lama5	ENSMUSG00000015647	1	2	1.00
Hspa4	ENSMUSG00000020361	1	2	1.00
Aebp1	ENSMUSG00000020473	1	2	1.00
Rabep1	ENSMUSG00000020817	1	2	1.00
Fam101b	ENSMUSG00000020846	1	2	1.00
C3	ENSMUSG00000024164	1	2	1.00
Hspa9	ENSMUSG00000024359	1	2	1.00
Fam129b	ENSMUSG00000026796	1	2	1.00
Zfp106	ENSMUSG00000027288	1	2	1.00

Gene Name	Gene ID	n Reads		
		EXO-CT	EXO-TNF	Δ Reads (log2)
Ccn1	ENSMUSG00000027829	1	2	1.00
Ptms	ENSMUSG00000030122	1	2	1.00
Bms1	ENSMUSG00000030138	1	2	1.00
Myom2	ENSMUSG00000031461	1	2	1.00
Map1lc3b	ENSMUSG00000031812	1	2	1.00
Mtss1l	ENSMUSG00000033763	1	2	1.00
Golgb1	ENSMUSG00000034243	1	2	1.00
Sbno2	ENSMUSG00000035673	1	2	1.00
Cnot1	ENSMUSG00000036550	1	2	1.00
Dap	ENSMUSG00000039168	1	2	1.00
Slc36a4	ENSMUSG00000043885	1	2	1.00
Nrd1	ENSMUSG00000053510	1	2	1.00
Gapdh	ENSMUSG00000057666	1	2	1.00
Naa15	ENSMUSG00000063273	1	2	1.00
Eef1g	ENSMUSG00000071644	1	2	1.00
Ube2d3	ENSMUSG00000078578	1	2	1.00
Ccng1	ENSMUSG00000020326	3	2	0.58
Sparc	ENSMUSG00000018593	2	2	0.00
Tpm2	ENSMUSG00000028464	2	2	0.00
Rpsa	ENSMUSG00000032518	2	2	0.00
Csrnp2	ENSMUSG00000044636	2	2	0.00
Sh3pxd2a	ENSMUSG00000053617	2	2	0.00
Gm22058	ENSMUSG00000065327	2	2	0.00
D8Erttd738e	ENSMUSG00000019362	9	1	3.17
Hmgn1	ENSMUSG00000040681	5	1	2.32
Cep170b	ENSMUSG00000072825	5	1	2.32
Gm15427	ENSMUSG00000081051	4	1	2.00
Npc2	ENSMUSG00000021242	3	1	1.58
mt-Atp6	ENSMUSG00000064357	3	1	1.58
Dio2	ENSMUSG00000007682	2	1	1.00
Rai14	ENSMUSG00000022246	2	1	1.00
Rpn2	ENSMUSG00000027642	2	1	1.00
Ybx1	ENSMUSG00000028639	2	1	1.00
Capg	ENSMUSG00000056737	2	1	1.00
Cenpb	ENSMUSG00000068267	2	1	1.00
Usp32	ENSMUSG00000000804	1	1	0.00
Calm1	ENSMUSG00000001175	1	1	0.00
Snrnp200	ENSMUSG00000003660	1	1	0.00
Kif5b	ENSMUSG00000006740	1	1	0.00
Cpt1c	ENSMUSG00000007783	1	1	0.00

Gene Name	Gene ID	n Reads		
		EXO-CT	EXO-TNF	Δ Reads (log2)
Evi5	ENSMUSG00000011831	1	1	0.00
Ptprs	ENSMUSG00000013236	1	1	0.00
Efr3a	ENSMUSG00000015002	1	1	0.00
Nbr1	ENSMUSG00000017119	1	1	0.00
Rhot1	ENSMUSG00000017686	1	1	0.00
Dync1h1	ENSMUSG00000018707	1	1	0.00
Shc2	ENSMUSG00000020312	1	1	0.00
Laptm4a	ENSMUSG00000020585	1	1	0.00
Ywhae	ENSMUSG00000020849	1	1	0.00
Hsp90aa1	ENSMUSG00000021270	1	1	0.00
Uqcrb	ENSMUSG00000021520	1	1	0.00
Zswim8	ENSMUSG00000021819	1	1	0.00
Nars	ENSMUSG00000024587	1	1	0.00
Hras	ENSMUSG00000025499	1	1	0.00
Cflar	ENSMUSG00000026031	1	1	0.00
Dst	ENSMUSG00000026131	1	1	0.00
Copa	ENSMUSG00000026553	1	1	0.00
Abl2	ENSMUSG00000026596	1	1	0.00
Ddr2	ENSMUSG00000026674	1	1	0.00
Pdia3	ENSMUSG00000027248	1	1	0.00
Cyr61	ENSMUSG00000028195	1	1	0.00
Rps20	ENSMUSG00000028234	1	1	0.00
B4galt1	ENSMUSG00000028413	1	1	0.00
Tmem38b	ENSMUSG00000028420	1	1	0.00
Vcp	ENSMUSG00000028452	1	1	0.00
Usp24	ENSMUSG00000028514	1	1	0.00
Prdx1	ENSMUSG00000028691	1	1	0.00
Rpl22	ENSMUSG00000028936	1	1	0.00
Plxna1	ENSMUSG00000030084	1	1	0.00
Cox7b	ENSMUSG00000031231	1	1	0.00
Rbbp7	ENSMUSG00000031353	1	1	0.00
Plat	ENSMUSG00000031538	1	1	0.00
N4bp1	ENSMUSG00000031652	1	1	0.00
Aars	ENSMUSG00000031960	1	1	0.00
Tle3	ENSMUSG00000032280	1	1	0.00
Hmg20a	ENSMUSG00000032329	1	1	0.00
Tpm1	ENSMUSG00000032366	1	1	0.00
Ptgs2	ENSMUSG00000032487	1	1	0.00
Eif3l	ENSMUSG00000033047	1	1	0.00
Lpp	ENSMUSG00000033306	1	1	0.00

Gene Name	Gene ID	n Reads		
		EXO-CT	EXO-TNF	Δ Reads (log2)
Fem1c	ENSMUSG00000033319	1	1	0.00
Mga	ENSMUSG00000033943	1	1	0.00
Zcchc11	ENSMUSG00000034610	1	1	0.00
Grn	ENSMUSG00000034708	1	1	0.00
Sos2	ENSMUSG00000034801	1	1	0.00
Eif2s3x	ENSMUSG00000035150	1	1	0.00
Tdrd7	ENSMUSG00000035517	1	1	0.00
Ankrd11	ENSMUSG00000035569	1	1	0.00
Ythdc1	ENSMUSG00000035851	1	1	0.00
Fnip1	ENSMUSG00000035992	1	1	0.00
Cyld	ENSMUSG00000036712	1	1	0.00
Phkb	ENSMUSG00000036879	1	1	0.00
Mxd4	ENSMUSG00000037235	1	1	0.00
Chmp4b	ENSMUSG00000038467	1	1	0.00
Ranbp9	ENSMUSG00000038546	1	1	0.00
Zbtb38	ENSMUSG00000040433	1	1	0.00
Ppp1r15a	ENSMUSG00000040435	1	1	0.00
Elmo1	ENSMUSG00000041112	1	1	0.00
Mtus1	ENSMUSG00000045636	1	1	0.00
Bst2	ENSMUSG00000046718	1	1	0.00
Rpl14-ps1	ENSMUSG00000046721	1	1	0.00
AI314180	ENSMUSG00000050812	1	1	0.00
Kif18b	ENSMUSG00000051378	1	1	0.00
Map1b	ENSMUSG00000052727	1	1	0.00
Repin1	ENSMUSG00000052751	1	1	0.00
Cnn3	ENSMUSG00000053931	1	1	0.00
Usp34	ENSMUSG00000056342	1	1	0.00
Tatdn2	ENSMUSG00000056952	1	1	0.00
Hnrnpc	ENSMUSG00000060373	1	1	0.00
Utp14a	ENSMUSG00000063785	1	1	0.00
mt-Co2	ENSMUSG00000064354	1	1	0.00
mt-Nd4	ENSMUSG00000064363	1	1	0.00
Lrch1	ENSMUSG00000068015	1	1	0.00
Flnc	ENSMUSG00000068699	1	1	0.00
Ubxn1	ENSMUSG00000071655	1	1	0.00
Gm16165	ENSMUSG00000089958	1	1	0.00

Tabela Suplementar 3 - Genes up-regulados em miotubos tratados com TNF- α

Genes	Gene Name	Controle (log2 FC)				TNF- α (log2 FC)			
		6d	8d	10d	Soma	4h	12h	24h	Soma
Fabp7	Fatty acid-binding protein, brain	-1.27	-0.82	-1.08	-3.16	0.18	2.63	3.08	5.89
Car8	Carbonic anhydrase-related protein	0.38	0.11	-0.50	0.00	0.20	1.71	2.37	4.29
Ly6a	Lymphocyte antigen 6A-2/6E-1	-0.22	-0.30	0.13	-0.40	0.52	1.33	1.83	3.68
Dhrs3	Short-chain dehydrogenase/reductase 3	-0.10	-0.22	0.50	0.17	1.22	1.10	1.35	3.67
Enpp1	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 1	0.13	0.06	0.50	0.70	0.44	1.45	1.76	3.65
Cxcr4	C-X-C chemokine receptor type 4	-0.40	-0.83	-1.15	-2.38	1.00	1.01	1.18	3.18
Capn6	Calpain-6	-0.43	-1.21	-1.00	-2.64	0.94	0.96	0.84	2.74
Kazald1	Kazal-type serine protease inhibitor domain-containing protein 1	0.20	0.47	0.10	0.77	0.34	1.05	1.25	2.65
Hpgd	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]	-2.31	-1.35	-1.65	-5.31	0.77	1.00	0.83	2.60
Rgs5	Regulator of G-protein signaling 5	0.24	-0.34	-0.58	-0.69	0.21	0.74	1.57	2.51
Ptgs2	Prostaglandin G/H synthase 2	-0.95	-1.13	-1.87	-3.95	-0.03	1.09	1.30	2.36
Dpysl3	Dihydropyrimidinase-related protein 3	-0.37	-0.92	-1.21	-2.50	0.31	0.95	1.06	2.32
Calcr1	Calcitonin gene-related peptide type 1 receptor	-1.17	-0.87	-0.95	-2.98	0.45	0.94	0.92	2.32
Npnt	Nephronectin	0.01	0.15	0.06	0.23	0.17	0.81	1.32	2.30
Gclc	Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit	0.12	0.05	0.12	0.29	0.29	0.97	0.99	2.25
Mcam	Cell surface glycoprotein MUC18	0.09	-0.49	-0.46	-0.86	0.05	1.20	1.00	2.25
Pde8a	High affinity cAMP-specific and IBMX-insensitive 3',5'-cyclic phosphodiesterase 8A	0.29	-0.30	0.38	0.37	0.09	0.86	1.25	2.20

Genes	Gene Name	Controle (log2 FC)				TNF- α (log2 FC)			
		6d	8d	10d	Soma	4h	12h	24h	Soma
Ret	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret	-0.09	0.37	-0.39	-0.10	0.17	0.82	1.21	2.19
Maf	Transcription factor Maf	0.53	-0.42	-0.26	-0.16	0.80	0.62	0.74	2.16
Rapgef4	Rap guanine nucleotide exchange factor 4	-2.27	-2.09	-0.94	-5.29	0.48	0.83	0.83	2.13
Anxa8	Annexin A8	0.04	-0.07	0.20	0.16	0.39	0.73	0.98	2.10
F3	Tissue factor	-1.07	-1.93	-2.11	-5.11	0.32	0.79	0.94	2.04
Cnn1	Calponin-1	0.58	-0.15	0.45	0.88	0.22	0.92	0.87	2.01
Srxn1	Sulfiredoxin-1	0.33	0.36	0.47	1.17	0.10	0.87	1.03	2.01
Crlf1	Cytokine receptor-like factor 1	0.51	-0.09	-0.16	0.26	0.04	0.74	1.21	1.99
Gclm	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	0.40	0.32	0.11	0.83	0.08	0.93	0.96	1.98
Sfrp2	Secreted frizzled-related protein 2	-0.17	0.23	0.02	0.08	0.44	0.91	0.61	1.96
Slc1a4	Neutral amino acid transporter A	0.13	0.24	-0.14	0.22	-0.14	0.96	1.12	1.95
Lgr5	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5	0.01	-0.07	0.47	0.40	0.45	0.77	0.71	1.93
Acvr2a	Activin receptor type-2A	0.22	0.26	0.24	0.73	0.53	0.62	0.77	1.91
Alcam	CD166 antigen	-0.30	-0.85	-0.64	-1.78	-0.14	0.66	1.39	1.91
Ptger4	Prostaglandin E2 receptor EP4 subtype	0.34	0.13	0.10	0.57	0.30	0.73	0.87	1.90
Myo1d	Unconventional myosin-Id	0.12	0.16	-0.01	0.27	0.19	0.73	0.97	1.89
BC023829	cDNA sequence BC023829	-0.05	-0.08	-0.12	-0.25	0.35	0.71	0.81	1.87
Ikkbg	NF-kappa-B essential modulator	0.14	0.25	0.21	0.61	0.34	0.70	0.83	1.87
Id3	DNA-binding protein inhibitor ID-3	-0.10	-0.07	-0.15	-0.32	0.52	0.69	0.66	1.86
Tiaf2	TGF-beta1-induced anti-apoptotic factor 2	-0.94	-0.74	-1.12	-2.80	0.26	0.71	0.87	1.84
Dlx2	Homeobox protein DLX-2	-0.15	-1.23	-0.96	-2.33	0.23	0.78	0.83	1.84
Prrx2	Paired mesoderm homeobox protein 2	0.07	-0.07	-0.18	-0.18	0.33	0.76	0.71	1.79

Genes	Gene Name	Controle (log2 FC)				TNF- α (log2 FC)			
		6d	8d	10d	Soma	4h	12h	24h	Soma
Fzd6	Frizzled-6	0.05	-0.37	-0.12	-0.44	0.43	0.71	0.63	1.76
Gpx3	Glutathione peroxidase 3	-0.23	-0.04	0.09	-0.18	0.33	0.64	0.77	1.74
Vcan	Versican core protein	-0.54	-0.34	-0.45	-1.33	0.04	0.66	1.02	1.73
Ptpm	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase mu	-0.25	-0.12	-0.09	-0.45	0.00	0.64	0.99	1.62
Cd24a	Signal transducer CD24	-0.14	0.21	0.09	0.17	0.05	0.66	0.91	1.61
Csrp2	Cysteine and glycine-rich protein 2	0.06	-0.27	-0.02	-0.23	0.08	0.69	0.80	1.57
Pkp2	Plakophilin 2	-0.40	-0.80	-0.60	-1.79	0.15	0.70	0.70	1.55
Cpox	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	-0.06	0.07	-0.14	-0.12	0.11	0.76	0.66	1.53
Pdk4	[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 4, mitochondrial	0.05	-0.06	-0.29	-0.30	-0.01	0.62	0.90	1.51
Fhl2	Four and a half LIM domains protein 2	-0.03	-0.31	-0.11	-0.44	0.13	0.60	0.71	1.43
Sat1	Diamine acetyltransferase 1	0.03	-0.53	-0.25	-0.75	0.03	0.74	0.61	1.37
Npr3	Atrial natriuretic peptide receptor 3	0.32	0.48	0.39	1.19	-0.40	0.66	1.10	1.37
Cnih2	Protein cornichon homolog 2	0.32	0.03	0.29	0.64	0.04	0.59	0.65	1.28
Foxc2	Forkhead box protein C2	0.06	-0.21	-0.24	-0.39	-0.04	0.60	0.72	1.28
Tgfb1i1	Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein	-0.30	-0.29	-0.45	-1.04	-0.01	0.67	0.60	1.26
Tubb3	Tubulin beta-3 chain	0.31	0.32	0.12	0.74	-0.12	0.59	0.68	1.14

obs: FC = Fold Change

Tabela Suplementar 4- Genes down-regulados em miotubos tratados com TNF- α

Genes	Gene Name	Controle (log2 FC)				TNF- α (log2 FC)			
		6d	8d	10d	Soma	4h	12h	24h	Soma
Casp4	Caspase-4	1.12	0.89	1.69	1.23	-1.72	-2.02	-2.06	-2.04
Cp	Ceruloplasmin	0.14	0.23	0.26	0.21	-0.82	-1.67	-2.20	-1.94
Vcam1	Vascular cell adhesion protein 1	-0.30	-0.47	-0.27	-0.35	-1.82	-1.84	-1.98	-1.91
Nfkbia	NF-kappa-B inhibitor alpha	-0.12	0.03	-0.12	-0.07	-2.05	-1.91	-1.84	-1.88
Tnfaip3	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3	0.35	-0.15	0.56	0.26	-2.11	-1.74	-1.91	-1.83
Ccl5	C-C motif chemokine 5	-0.18	0.01	-0.58	-0.25	-0.72	-1.56	-2.01	-1.79
Bcl3	B-cell lymphoma 3 protein homolog	0.87	0.86	0.82	0.85	-1.93	-1.72	-1.84	-1.78
Cdkn1c	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C	0.57	0.30	0.24	0.37	0.12	-1.23	-1.87	-1.55
Saa3	Serum amyloid A-3 protein	-0.08	0.35	-0.44	-0.06	-0.60	-1.56	-1.53	-1.54
Plscr2	Phospholipid scramblase 2	0.38	0.16	-0.39	0.05	-0.85	-1.42	-1.57	-1.49
Tnip1	TNFAIP3-interacting protein 1	-0.06	0.19	-0.02	0.04	-1.02	-1.38	-1.59	-1.49
Tmem176b	Transmembrane protein 176B	0.24	0.21	0.35	0.27	-0.34	-1.32	-1.62	-1.47
Myog	Myogenin	0.03	0.13	0.17	0.11	-0.24	-1.20	-1.74	-1.47
Tapbp	Tapasin	-0.29	-0.27	-0.20	-0.25	-0.63	-1.38	-1.54	-1.46
Cd74	H-2 class II histocompatibility antigen gamma chain	0.48	0.66	0.79	0.64	-0.74	-1.40	-1.45	-1.43
H2-K1	H-2 class I histocompatibility antigen, K-B alpha chain	-0.23	0.06	0.02	-0.05	-0.78	-1.37	-1.47	-1.42
Dync1i1	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 1	-0.41	-0.28	-0.44	-0.38	-0.05	-1.22	-1.54	-1.38
Relb	Transcription factor RelB	0.04	0.29	0.19	0.18	-1.41	-1.19	-1.28	-1.24
Ctrb1	Chymotrypsinogen B	0.77	0.94	1.04	0.92	0.18	-0.65	-1.80	-1.23
Rgs16	Regulator of G-protein signaling 16	-0.07	0.01	0.04	-0.01	-0.76	-1.18	-1.27	-1.23
Lbp	Lipopolysaccharide-binding protein	0.07	0.57	0.53	0.39	-0.27	-1.11	-1.25	-1.18
Idi1	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1	0.21	-0.37	-0.51	-0.22	-0.10	-1.40	-0.94	-1.17

Genes	Gene Name	Controle (log2 FC)				TNF- α (log2 FC)			
		6d	8d	10d	Soma	4h	12h	24h	Soma
Nfkb2	Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit	-0.09	-0.15	-0.37	-0.20	-1.29	-1.14	-1.16	-1.15
Postn	Periostin	-0.03	-0.07	0.32	0.07	0.18	-0.90	-1.36	-1.13
Angptl4	Angiopoietin-related protein 4	0.03	0.09	0.07	0.06	-0.65	-0.92	-1.31	-1.12
H2-Q4	Protein H2-Q4	0.08	-0.13	0.20	0.05	-0.39	-0.95	-1.25	-1.10
Myom2	Myomesin 2	0.08	0.21	0.07	0.12	-0.14	-0.85	-1.34	-1.09
Mycl	Protein L-Myc	0.03	-0.08	0.47	0.14	-0.60	-0.99	-1.12	-1.05
Fas	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6	0.39	-0.47	-0.40	-0.16	-1.50	-1.07	-1.03	-1.05
Itga7	Integrin alpha-7	0.04	0.31	0.26	0.20	-0.45	-0.88	-1.19	-1.04
Dhcr24	Delta(24)-sterol reductase	-0.03	0.42	-0.08	0.11	-0.03	-1.05	-0.94	-1.00
Fndc1	Protein Fndc1	-0.01	0.46	0.58	0.34	0.31	-0.64	-1.35	-0.99
Psmb10	Proteasome subunit beta type-10	-0.12	-0.10	0.03	-0.06	-0.46	-0.82	-1.11	-0.97
St8sia4	CMP-N-acetylneuraminate-poly-alpha-2,8-sialyltransferase	0.70	1.01	0.67	0.79	-0.31	-0.88	-1.05	-0.97
Vegfc	Vascular endothelial growth factor C	0.39	-0.15	-0.30	-0.02	-1.07	-1.00	-0.92	-0.96
Tnfrsf9	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 9	-0.50	0.16	-0.09	-0.15	-0.31	-0.77	-1.13	-0.95
Birc3	Baculoviral IAP repeat-containing protein 3	-0.27	-0.28	-0.45	-0.33	-0.43	-0.91	-0.97	-0.94
Casp12	Caspase-12	-0.12	-0.05	0.25	0.02	0.05	-0.81	-1.08	-0.94
Gbp3	Guanylate-binding protein 4	0.41	0.35	0.25	0.33	-0.61	-0.71	-1.12	-0.92
Il1rl1	Interleukin-1 receptor-like 1	0.11	-0.24	-0.41	-0.18	-0.19	-0.88	-0.94	-0.91
Rrad	GTP-binding protein RAD	0.66	0.97	1.12	0.92	-1.03	-0.84	-0.96	-0.90
Msln	Mesothelin	0.11	0.18	0.16	0.15	-0.09	-0.77	-1.03	-0.90
Ube2l6	Ubiquitin/ISG15-conjugating enzyme E2 L6	0.86	0.60	0.89	0.78	-0.36	-0.79	-0.99	-0.89
Dapk2	Death-associated protein kinase 2	0.14	0.16	0.46	0.25	-0.55	-0.84	-0.92	-0.88
Fdps	Farnesyl pyrophosphate synthase	0.11	-0.21	0.12	0.00	-0.01	-1.00	-0.77	-0.88

Genes	Gene Name	Controle (log2 FC)				TNF- α (log2 FC)			
		6d	8d	10d	Soma	4h	12h	24h	Soma
Nsdhl	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	0.24	-0.23	-0.22	-0.07	0.05	-1.05	-0.71	-0.88
Spata13	Spermatogenesis-associated protein 13	-0.12	-0.19	-0.02	-0.11	-0.68	-0.83	-0.90	-0.87
Ablim1	Actin-binding LIM protein 1	0.44	0.48	0.48	0.47	-0.13	-0.77	-0.97	-0.87
Cd34	Hematopoietic progenitor cell antigen CD34	-0.11	-0.20	0.01	-0.10	-0.14	-0.88	-0.84	-0.86
Mvp	Major vault protein	-0.11	0.13	0.02	0.01	-0.46	-0.86	-0.86	-0.86
Ifngr2	Ifngr2 protein	-0.05	0.12	-0.36	-0.10	-0.85	-0.81	-0.87	-0.84
Mvk	Mevalonate kinase	0.02	-0.02	-0.21	-0.07	0.09	-0.84	-0.74	-0.79
Acpp	Prostatic acid phosphatase	0.37	-0.45	0.46	0.13	-0.28	-0.80	-0.77	-0.78
Msmo1	Methylsterol monooxygenase 1	0.32	-0.02	0.00	0.10	-0.22	-0.90	-0.66	-0.78
Zeb1	Zinc finger E-box-binding homeobox 1	0.02	0.04	0.36	0.14	-0.37	-0.73	-0.82	-0.78
Mfap5	Microfibrillar-associated protein 5	0.10	0.29	0.42	0.27	0.00	-0.61	-0.91	-0.76
Spg21	Masparidin	-0.10	0.09	-0.11	-0.04	-0.06	-0.61	-0.87	-0.74
Mettl20	Electron transfer flavoprotein beta subunit lysine methyltransferase	0.09	0.47	0.28	0.28	-0.15	-0.75	-0.71	-0.73
Unc93b1	Protein unc-93 homolog B1	0.27	0.57	0.21	0.35	0.05	-0.64	-0.81	-0.72
Adora1	Adenosine receptor A1	0.48	0.75	1.71	0.98	-0.07	-0.64	-0.76	-0.70
Il10rb	Interleukin-10 receptor subunit beta	0.18	-0.37	-0.02	-0.07	-0.75	-0.62	-0.76	-0.69
Col8a1	Collagen alpha-1(VIII) chain	0.43	0.26	0.41	0.37	-0.26	-0.60	-0.75	-0.67
Slc12a2	Solute carrier family 12 member 2	0.35	0.56	0.30	0.40	-0.31	-0.64	-0.70	-0.67
Fdft1	Squalene synthase	0.13	-0.25	-0.11	-0.08	0.14	-0.74	-0.60	-0.67
Psmc10	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10	0.30	0.19	0.23	0.24	-0.34	-0.65	-0.67	-0.66
Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1	-0.19	-0.55	-0.41	-0.38	-0.18	-0.69	-0.61	-0.65
Mvd	Diphosphomevalonate decarboxylase	0.16	-0.03	-0.08	0.02	-0.09	-0.69	-0.60	-0.64

Genes	Gene Name	Controle (log2 FC)				TNF- α (log2 FC)			
		6d	8d	10d	Soma	4h	12h	24h	Soma
Fah	Fumarylacetoacetase	-0.10	-0.42	-0.24	-0.25	0.18	-0.59	-0.64	-0.62
H2-D1	H-2 class I histocompatibility antigen, D-P alpha chain	-0.07	-0.15	-0.11	-0.11	-0.33	-0.59	-0.59	-0.59

obs: FC = Fold Change

Tabela suplementar 5 - Alvos preditos por $3 \geq$ algoritmos que estão down-regulados em miotubos

miRNA UP	Genes Down	Nome do Gene
mmu-miR-30b-5p	Adora1	Adenosine receptor A1
mmu-miR-146a-5p	Adora1	Adenosine receptor A1
mmu-miR-30b-5p	Spata13	Spermatogenesis-associated protein 13
mmu-miR-146a-5p	Spata13	Spermatogenesis-associated protein 13
mmu-miR-30b-5p	St8sia4	CMP-N-acetylneuraminate-poly-alpha-2,8-sialyltransferase
mmu-miR-365-3p	St8sia4	CMP-N-acetylneuraminate-poly-alpha-2,8-sialyltransferase
mmu-miR-30b-5p	Tapbp	Tapasin
mmu-miR-146a-5p	Tapbp	Tapasin
mmu-miR-365-3p	Zeb1	Zinc finger E-box-binding homeobox 1
mmu-miR-30b-5p	Zeb1	Zinc finger E-box-binding homeobox 1
mmu-miR-146a-5p	Ablim1	Actin-binding LIM protein 1
mmu-miR-30b-5p	Acpp	Prostatic acid phosphatase
mmu-miR-146a-5p	Bcl3	B-cell lymphoma 3 protein homolog
mmu-miR-146a-5p	Dapk2	Death-associated protein kinase 2
mmu-miR-365-3p	Dync1i1	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 1
mmu-miR-146a-5p	Fdft1	Squalene synthase
mmu-miR-146a-5p	Fndc1	Protein Fndc1
mmu-miR-146a-5p	H2-D1	H-2 class I histocompatibility antigen, D-P alpha chain
mmu-miR-30b-5p	H2-K1	H-2 class I histocompatibility antigen, K-B alpha chain
mmu-miR-365-3p	Il1r1	Interleukin-1 receptor-like 1
mmu-miR-30b-5p	Mfap5	Microfibrillar-associated protein 5
mmu-miR-146a-5p	Mycl	Protein L-Myc
mmu-miR-30b-5p	Psm10	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10
mmu-miR-30b-5p	Rgs16	Regulator of G-protein signaling 16
mmu-miR-30b-5p	Rrad	GTP-binding protein RAD
mmu-miR-146a-5p	Slc12a2	Solute carrier family 12 member 2
mmu-miR-365-3p	Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1
mmu-miR-30b-5p	Unc93b1	Protein unc-93 homolog B1

Em **negrito** são apresentados alvos que tiveram mais de um miRNAs predito

Tabela suplementar 6 - Alvos preditos por 3 \geq algoritmos que estão up-regulados em miotubos

miRNA Down	Alvo Up	Nome do Gene
mmu-miR-214-3p	Ly6a	Lymphocyte antigen 6A-2/6E-1
mmu-miR-34c-3p	Ly6a	Lymphocyte antigen 6A-2/6E-1
mmu-miR-214-3p	Myo1d	Unconventional myosin-Id
mmu-miR-484	Myo1d	Unconventional myosin-Id
mmu-miR-214-3p	Npr3	Atrial natriuretic peptide receptor 3
mmu-miR-34c-3p	Npr3	Atrial natriuretic peptide receptor 3
mmu-miR-214-3p	Slc1a4	Neutral amino acid transporter A
mmu-miR-484	Slc1a4	Neutral amino acid transporter A
mmu-miR-214-3p	Acvr2a	Activin receptor type-2A
mmu-miR-484	Anxa8	Annexin A8
mmu-miR-214-3p	BC023829	cDNA sequence BC023829
mmu-miR-214-3p	Car8	Carbonic anhydrase-related protein
mmu-miR-214-3p	Cd24a	Signal transducer CD24
mmu-miR-214-3p	Crlf1	Cytokine receptor-like factor 1
mmu-miR-484	Cxcr4	C-X-C chemokine receptor type 4
mmu-miR-484	Dhrs3	Short-chain dehydrogenase/reductase 3
mmu-miR-484	F3	Tissue factor
mmu-miR-214-3p	Gclc	Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit
mmu-miR-214-3p	Gclm	Glutamate-cysteine ligase regulatory subunit
mmu-miR-484	Id3	DNA-binding protein inhibitor ID-3
mmu-miR-214-3p	Maf	Transcription factor Maf
mmu-miR-34c-3p	Pdk4	Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 4, mitochondrial
mmu-miR-484	Ptger4	Prostaglandin E2 receptor EP4 subtype
mmu-miR-214-3p	Rapgef4	Rap guanine nucleotide exchange factor 4
mmu-miR-214-3p	Ret	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret
mmu-miR-484	Srxn1	Sulfiredoxin-1
mmu-miR-214-3p	Tubb3	Tubulin beta-3 chain
mmu-miR-34c-3p	Vcan	Versican core protein

Em **negrito** são apresentados alvos que tiveram mais de um miRNAs predito