WILLIAM JOSÉ DA SILVA

MicroRNAs em plasticidade muscular: efeitos da superexpressão do miR-29c na modulação da massa muscular esquelética

Versão Original

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para o Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais.

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot

São Paulo

2019

RESUMO

SILVA, W. J. **MicroRNAs em plasticidade muscular: efeitos da superexpressão do miR-29c na modulação da massa muscular esquelética**. 168 f. Tese (Doutorado em Ciências). São Paulo: Universidade de São Paulo; 2019.

O músculo esquelético é o tecido mais abundante do organismo, é importante em diversas habilidades básicas nas atividades de vida diária, como: movimento, postura corporal e respiração, além de outros processos fisiológicos importantes para manutenção do equilíbrio metabólico e defesa imunológica. Para se manter em adequado funcionamento, o músculo esquelético possui uma alta plasticidade, remodelando sua estrutura e função de acordo com as exigências do ambiente. Os microRNAs são pequenos RNAs não codificadores de proteínas que podem regular a expressão gênica a nível pós-transcricional. Nas últimas décadas o conhecimento dos microRNAs na biologia do músculo esquelético vem abrindo portas para novas abordagens que visam otimizar a boa saúde da musculatura esquelética. Neste trabalho, nosso principal objetivo foi identificar e caracterizar microRNAs com potencial de modulação da regeneração e massa muscular esquelética. Utilizamos uma análise *in silico* para identificar os microRNAs que tem como alvo predito genes associados a vias que regulam a regeneração e massa muscular, em seguida manipulamos *in vitro* (células C2C12) e *in vivo* (camundongos C57BL/6) a expressão desses microRNAs, analisando a expressão desses genes e as consequências nas células e no tecido muscular. Na primeira parte deste trabalho, analisamos a hipótese de que certos microRNAs poderiam regular a expressão de MuRF1 e MuRF2 (E3-ligase importantes para o processo de regeneração muscular). Identificamos os microRNAs miR-29c e miR-101a que têm como alvo predito MuRF1, e miR-133a e miR-133b que tem como alvo predito MuRF2. MuRF1 é induzido nos primeiros estágios do processo de regeneração muscular e seus miRs potencialmente reguladores são reprimidos durante esse processo. A superexpressão de miR-29c e miR-101a reduz a expressão de MuRF1 em células C2C12, enquanto que, em um ensaio de luciferase, validamos MuRF1 como alvo direto apenas do miR-29c. Além disso, a superexpressão de miR-29c durante a diferenciação de células C2C12 promove a miogênese, com aumento do diâmetro e índice de fusão de miotubos, enquanto que a superexpressão do miR-101a provocou uma redução no diâmetro dos miotubos. Na segunda parte deste trabalho, identificamos *in silico* o miR-29c como um potencial regulador da massa muscular esquelética, em seguida através de um método de entrega gênica por meio de eletroporação, superexpressamos o miR-29c no músculo de camundongos. A superexpressão do miR-29c, promoveu um aumento da massa e do número de sarcomeros em série, com ganho de força e função no músculo e esse efeito foi acompanhado de um remodelamento tecidual com aumento do número de células satélite ativadas. Tomados juntos, nossos resultados revelam que o miR-29c tem um efeito hipertrófico com ganho de função. A superexpressão deste microRNA pode ser uma ferramenta útil para futuras abordagens terapêuticas que visem a manipulação da massa muscular esquelética.

Palavras-chave: microRNA. miR-29c. miR-101a. Hipertrofia muscular. Atrofia muscular. Plasticidade muscular.

ABSTRACT

SILVA, W. J. **MicroRNAs in muscle plasticity: overexpression of miR-29c in modulation of skeletal muscle mass.** 168 p. Ph.D. Thesis (Doctor in Sciences). São Paulo: University of São Paulo; 2019.

The skeletal muscle is the body most abundant tissue. It plays an important role in daily life activities, such as movement, posture, and breathing. In addition, this tissue is crucial at physiological processes like metabolic equilibrium and immune defense. The substantial adaptability in response to environmental change marks skeletal muscle as a plastic organ. This plasticity could be coordinated by microRNAs, those are small non-protein-coding RNAs that regulate post-transcriptional gene expression. This knowledge has fostered new approaches that aim to optimize the skeletal muscle health. Thus, in this work, we intended to identify and characterize microRNAs that modulate the muscle mass and the regeneration process. An *in silico* analyses has allowed the identification of microRNAs who possibly bind genes from pathways of skeletal muscle mass control and regeneration. After, we manipulated the expression of those microRNAs on C2C12 cells and C57BL/6 mice. Finally, we measured the transcriptional levels of target genes and the impact of these alterations on the cells and on muscle tissue. In the first section of this work, we hypothesized that microRNAs could regulate MURF1 and MURF2 expression, both E3-ligases important for the regeneration process. In our analysis, MURF1 was a predictable target of miR-29c and miR-101a while for MURF2 were identified miR-133a and 133b. During the regeneration process, MURF1 is up-regulated and its predicted target microRNAs are downregulated. In this context the hyperexpression of both miR-29c and miR-101a in C2C12 cells induced MURF1 down-regulation. Furthermore, miR-29c promotes myogenesis with an increase in myotubes diameter and fusion index. In contrast, miR-101a expression reduces myotubes diameter with no change at the fusion index. Lastly, luciferase assay validated only miR-29c directly target MURF1 3'UTR. In the second section of this work, we identified miR-29c as a potential regulator of skeletal muscle mass. Then through gene delivery by electroporation, we induce miR-29c overexpression in mice skeletal muscle. This procedure promoted an increase in muscle mass as well as a gain in strength, endurance and sarcomere number, furthermore the number of activated satellite cells. Taken together our results found that miR-29c has a hypertrophic effect with gain in muscle function. Thus, the overexpression of this microRNA could be a useful tool for future therapeutics that manipulate muscle mass.

Keywords: microRNA, miR-29c, miR-101a, muscle hypertrophy, muscle atrophy, muscle regeneration, muscle plasticity

1. INTRODUÇÃO

1.1 Plasticidade muscular esquelética

O tecido muscular esquelético possui um alto grau de especialização e é um dos tecidos mais abundantes do organismo, correspondendo a cerca de 40% da massa corporal total. Dentre outras funcionalidades, se destaca pela produção de força, viabilizando importantes características entre as quais se destaca o movimento e a manutenção da postura corporal (Frontera and Ochala, 2015). Outras funções correlatas também são de extrema relevância, tais como: controle do retorno venoso (A. K. Verma et al., 2017), motilidade do globo ocular (Porter et al., 1995; M. Verma et al., 2017), manutenção da termogênese (Rowland et al., 2015) e controle da respiração (Gransee et al., 2012). O músculo esquelético também desempenha um importante papel em outros processos fisiológicos e homeostáticos do organismo, por exemplo, é uma das principais fontes endógenas de glutamina, um nutriente essencial para a atividade de células do sistema imunológico (Walsh et al., 1998). Além disso, o tecido muscular é a principal reserva de aminoácidos que pode ser recrutada como substrato energético em situações envolvendo diminuição da disponibilidade de carboidratos e gorduras (Wolfe, 2006).

Para manter o equilíbrio fisiológico, o músculo esquelético é dotado de grande capacidade de modificar sua composição celular e molecular afim de se adaptar as demandas inerentes às atividades cotidianas ou em doenças e condições que desencadeiem algum desequilíbrio fisiológico (Baldwin and Haddad, 2002). Por exemplo, em situações envolvendo diminuição do uso do músculo provocam uma resposta adaptativa chamada de atrofia. Por outro lado, situações envolvendo atividade muscular com aumento de resistência levam a uma resposta chamada de hipertrofia (Boonyarom and Inui, 2006). Uma outra importante característica é a capacidade do músculo sofrer regeneração frente às agressões ocasionadas pela própria atividade contrátil e outras injúrias de várias origens (Tedesco et al., 2010). Para melhor elucidar e fornecer uma breve revisão da literatura estes processos (atrofia, hipertrofia e regeneração) serão abordados em tópicos, antecidos por uma breve descrição de aspectos da composição da fibra muscular.

1.1.1 Principais aspectos estruturais e funcionais da fibra muscular

As células musculares (fibras musculares ou miofibras) são capazes de se contrair que, resumidamente, é a capacidade destas células de coordenadamente diminuir seu comprimento, gerando tensão ativa o que também é descrito como força. Se não considerarmos o conteúdo de água, as fibras musculares possuem uma alta densidade proteica (~80%) (Frontera and Ochala, 2015). Este enorme conteúdo proteico, compreende proteínas envolvidas com a formação do arcabouço estrutural de um citoesqueleto, altamente especializado com proteínas contráteis, além de proteínas regulatórias. As proteínas contráteis mais abundantes são actina e miosina (~70% do conteúdo proteico total de uma única fibra), e estas se organizam em filamentos que se interdigitam formando estruturas cilíndricas alongadas maiores, denominadas de miofibrilas (Frontera and Ochala, 2015).

As miofibrilas são as maiores estruturas encontradas na fibra muscular, se estendendo por todo comprimento das fibras musculares dispostas em paralelo em várias centenas. Os filamentos contráteis de actina e miosina também chamados de miofilamentos, se organizam em um padrão altamente ordenado e característico, formando regiões de densidade variada que podem ser observadas na microscopia eletrônica (Hoppeler et al., 1973), os chamados sarcômeros, que são as unidades contráteis básicas do músculo estriado. O grau de interdigitação coordenado dos miofilamentos nos sarcômeros faz com que todo o músculo oscile em um estado de tensão ativa (quando os miofilamentos estão mais interdigitados) ou relaxamento (quando estão menos interdigitados). A capacidade de geração de tensão ativa (força) é diretamente proporcional ao número de sarcômeros em paralelo dentro da fibra muscular (Chromiak and Antonio, 2008).

A perda e ganho da massa muscular, consequentemente a sua capacidade de gerar tensão ativa, estão diretamente relacionados à depleção ou aquisição de proteínas sarcoméricas. Estes processos, são controlados pelo contínuo *turnover* de proteínas, em que o balanço entre a síntese (anabolismo proteico) e a degradação (catabolismo proteico) destas, determinam a massa e função muscular. Desta forma, uma redução da síntese ou aumento da degradação proteica leva ao processo de atrofia, e o processo inverso, leva à hipertrofia (Boonyarom and Inui, 2006).

1.1.2 Regulação da massa muscular, atrofia e hipertrofia

A atrofia muscular é desencadeada pela redução da síntese de proteínas ou pelo aumento da degradação das mesmas, causando a perda de massa muscular e a redução da área de secção transversal das fibras musculares. Algumas das principais consequências desta condição é a redução do número de sarcômeros em paralelo e diminuição da força muscular (Boonyarom and Inui, 2006). Assim por exemplo, a diminuição da solicitação mecânica para o músculo provoca rápida perda de volume das fibras musculares, em indivíduos com baixa mobilidade, com imobilização de membros após uma fratura (Appell, 1990; Booth, 1982) ou em regime de microgravidade devido a viagens espaciais (Fitts et al., 2000). Além disso, o processo atrófico também pode ser observado durante o uso prolongado de glicocorticoides (Schakman et al., 2013), na restrição alimentar (Paul et al., 2012) ou na sarcopenia durante o envelhecimento (Wilkinson et al., 2018).

A atrofia também pode estar associada a doenças e síndromes, tais como: traumas, neuropatia diabética, neuropatia alcoólica, anemia perniciosa, esclerose lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular espinhal (AME), poliomielite (Bongers et al., 2013), sepse (Callahan and Supinski, 2009), insuficiência cardíaca (Von Haehling et al., 2013), insuficiência renal (Wang and Mitch, 2014), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Barreiro and Jaitovich, 2018), síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Dudgeon et al., 2006) e na síndrome metabólica da caquexia associada ao câncer (Porporato, 2016).

Na maior parte das condições atroficas o processo de catabolismo proteico é um dos principais desencadeadores do processo de atrofia muscular esquelética (Wing et al.; Zhang et al., 2007). O processo atrófico envolve a participação de três grandes sistemas proteolíticos intracelulares: o sistema proteolítico dependente de cálcio (Ca^{+2}), sistema lisossomal e o sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma (UbP) (Jackman, 2004). Nas células de mamíferos, o sistema proteolítico UbP é o responsável pela maior parte da degradação proteica intracelular (Rock et al., 1994), e está altamente ativado na maioria dos quadros atroficos, já citados acima (Bodine and Baehr, 2014; Jackman, 2004).

No sistema UbP, as E3 ligases Atrogin-1, também conhecida como MAFbx (*Muscle Atrophy F-box*) e MuRF1 (*Muscle Ring Finger 1*), são algumas das enzimas responsáveis por especificar proteínas como por exemplo, as proteínas contrateis que formam os sarcômeros como a actina,

miosina e troponina, para serem degradadas no sistema proteolítico proteossoma 26S (Khalil, 2018). Estas duas E3 ligases são altamente expressas em diversos modelos e condições atroficas e por isso são mais conhecidos na literatura como atrogenes (S. C. Bodine et al., 2001; Bodine and Baehr, 2014; Gomes et al., 2001). Diversos trabalhos demonstram que a inibição destes atrogenes, são suficientes para atenuar a atrofia em modelos *in vitro* (Eddins et al., 2011) e *in vivo*, como modelos de atrofia por desnervação (S. C. Bodine et al., 2001) e na caquexia cardíaca (Bowen et al., 2017), demonstrando assim que estes genes são potenciais alvos para terapias que visam a atenuação do quadro atrofico.

Uma das principais vias moleculares de regulação da expressão dos atrogenes é a da família de fatores de transcrição *Forkhead box O* (FoxO), onde se destacam os membros FoxO1 e FoxO3. Durante situações atroficas, estes FoxOs migram do citoplasma para o núcleo e promovem a transcrição dos atrogenes. A atividade de FoxO pode ser regulada pela AKT (*serine-threonine protein kinase*), através da fosforilação de FoxOs no citoplasma, do qual o impede de migrar para o núcleo, consequentemente reduzindo a expressão dos atrogenes (Sandri et al., 2004).

Outras vias também podem se comunicar com o sistema UbP e promover o processo de atrofia via ativação dos atrogenes, assim por exemplo: Nf- κ B é um fator de transcrição relacionado as reações inflamatórias, Wu et al. (2014) demonstraram que NF- κ B é suficiente para induzir a expressão de MuRF1 durante a atrofia induzida por suspensão de cauda em modelo animal. A miostatina é um dos principais reguladores negativos da massa muscular esquelética (McPherron et al., 1997; Schuelke et al., 2004) e pode ativar os atrogenes e FoxOs através da proteína Smad2/3 (Tando et al., 2016) e pela inibição da AKT (McFarlane et al., 2006).

A relação entre a perda de massa muscular nos processos de atrofia e o aumento da mortalidade podem ser observados em diversos casos clínicos em que o quadro atrofico se instala, como por exemplo, em pacientes com DPOC (Doença pulmonar obstrutiva crônica) (Schols et al., 1998), na caquexia associada ao câncer (Bruggeman et al., 2016) e na sarcopenia em idosos (Chuang et al., 2014), demonstrando assim a importância da manutenção da massa muscular esquelética para a saúde, qualidade de vida e longevidade.

O contrario da atrofia, a hipertrofia muscular, é caracterizada pelo aumento da massa e da área de seção transversal das fibras musculares como um resultado da alteração do *turnover* de proteínas em favor do acumulo de proteína. Diversos estímulos anabólicos podem promover a hipertrofia muscular, dentre estes, podemos citar a sobrecarga de trabalho mecânico por meio dos

exercícios físicos (Schoenfeld, 2010), tratamento com hormônios anabolizantes, como a testosterona ou moléculas sintéticas (Herbst and Bhasin, 2004), e a estimulação adrenérgica (Navegantes et al., 2002).

O aumento da síntese proteica durante o processo de hipertrofia, é em grande parte, resultado da indução da sinalização da via PI3K/AkT/mTOR. Como resultado, o complexo mTORC (*mammalian target of rapamycin complex 1*) é fosforilado e ativado, levando ao aumento da tradução proteica, intermediada por P70^{S6k} e 4e-BP1 (Rommel et al., 2001; Sandri, 2008). IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) é frequentemente referido como o mais importante hormônio anabólico em mamíferos, isto por que é o principal ativador da via PI3K/AkT/mTOR.

A indução de IGF-1, por exemplo, promove a hipertrofia muscular durante exercícios físicos (Schoenfeld, 2010), hipertrofia em miotubos (Rommel et al., 2001) atenuação da atrofia (Day et al., 2002). Animais transgênicos para IGF-1 exibem um grande crescimento muscular (Musrò et al., 2001). Além de IGF-1, também podemos citar outras vias de sinalização que contribuem para a hipertrofia muscular, tais como: Calcineurina (Sakuma and Yamaguchi, 2010), c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) (Lessard et al., 2018), PGC-1 α (Ruas et al., 2012) e Wnt/ β -catenina (Armstrong and Esser, 2005).

O sistema nervoso simpático (SNS) também tem um efeito anabólico no músculo esquelético, especialmente através da estimulação dos receptores $\beta 2$ adrenérgicos. As catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) ou mesmo moléculas $\beta 2$ -agonista sintéticas, podem exercer efeito inibitório no catabolismo proteico desencadeado pelo sistema proteolítico dependente de cálcio (Ca^{+2}), além de induzir efeitos hipertróficos no músculo esquelético e atenuar o catabolismo proteico em algumas condições atroficas (Lynch and Ryall, 2008; Navegantes et al., 2002).

Em humanos o exercício físico é a maneira mais comumente utilizada para se induzir hipertrofia muscular, além de contribuir para prevenção de doenças e aumento da longevidade. O aumento do IGF-1 pode ser observado durante exercícios de resistência e este aumento pode variar de acordo com idade (Bamman et al., 2001; Hameed et al., 2003). Também é conhecido que os exercícios de resistência podem induzir uma resposta regenerativa devido ao dano tecidual promovido pelo estresse mecânico durante o treinamento físico (Bazgir et al., 2016).

O processo regenerativo (descrito com mais detalhes na seção 1.1.3) envolve ativação das células satélite (células precursoras miogênicas). Estas células por sua vez podem facilitar a

hipertrofia muscular, doando seus núcleos para as fibras musculares existentes e aumentando a capacidade de síntese de proteínas contráteis nestas fibras (Moss and Leblond, 1971; Toigo and Boutellier, 2006), ou ainda participando do reparo tecidual das micro-lesões, que acontecem após o treinamento de resistência (Bazgir et al., 2016).

Ainda é controverso a importância das células satélite no processo de hipertrofia muscular, uma vez que alguns autores demonstraram que a ativação destas células não é essencial para o desenvolvimento da hipertrofia (McCarthy et al., 2011), no entanto outros trabalhos demonstraram o aumento da atividade das células satélite em diversos tipos de treinamento físico, indicando que o processo de miogênese também participa do remodelamento do músculo durante a hipertrofia (Bazgir et al., 2016).

1.1.3 Regeneração muscular esquelética

A regeneração muscular esquelética recapitula muitos aspectos da miogênese embrionária, sendo no tecido adulto um importante processo para manutenção da estrutura tecidual muscular e homeostase do organismo. Durante o período embrionário as células precursoras miogênicas provenientes dos somitos são induzidas à diferenciação até a formação do músculo maduro. Depois do desenvolvimento este programa molecular pode ser reativado, permitindo ao tecido se reconstruir após uma lesão (Chargé and Rudnicki, 2004; Järvinen et al., 2013).

Pax3 e Pax7 são fatores de transcrição *paired-box*, co-expressos na maioria das células precursoras miogênicas durante o período de desenvolvimento. Pax3 é essencial para migração de células precursoras musculares dos somitos e é expresso especialmente no período embrionário, enquanto que Pax7 desempenha um papel crítico para formação do músculo no período pós-natal, e para a manutenção da proliferação das células satélite após sua ativação (Chargé and Rudnicki, 2004; Sambasivan et al., 2011). As células satélite são células precursoras miogênicas que na fase tardia da miogênese embrionária não entram no programa de diferenciação e permanecem intimamente associadas com as fibras musculares em estado quiescente, para assim manter um *pool* de células precursoras miogênicas que são ativadas quando necessárias, mantendo-se assim, localizadas entre a lâmina basal e a membrana plasmática da fibra muscular (também denominada sarcolema) (Chargé and Rudnicki, 2004).

No músculo adulto a regeneração é altamente dependente da ativação das células satélite. Após uma injúria estas células entram no ciclo celular, proliferando intensamente e enquanto uma fração retorna ao estágio quiescente, uma outra fração de células se diferencia, se fusionando entre si, formando fibras rudimentares chamadas de miotubos que já começam a síntese de proteínas contráteis, como a miosina embrionária (eMHC). Uma outra fração destas mesmas células, também comprometidas com o processo de diferenciação, pode se fundir à fibras musculares adjacentes que estejam danificadas, doando assim novos núcleos para contribuir com a reconstituição desta. Ao final deste processo ocorre a formação de novos miotubos pós-mitóticos multinucleados (Tedesco et al., 2010).

A atividade das células satélite é, em grande parte, governada por fatores denominados de MRFs (Myogenic Regulators Factors) que compreendem, Myf5, MRF4, MyoD e Miogenina (MyoG). Estes fatores são fundamentais para a formação das células musculares durante a fase de embriogênese e durante a regeneração muscular pós-natal. Enquanto que Myf5 e MyoD são requisitados para o processo de especificação e diferenciação, MyoG e MRF4 são essenciais para o término do processo de diferenciação dos miotubos (Karalaki et al.; Musarò, 2014). O processo miogênico também pode ser regulado a nível epigenético, por exemplo, através da repressão de MRFs, por mecanismos envolvendo as histona deacetilases (HDACs) e complexos co-repressores do Polycomb Group proteins (PcG), sendo que a repressão destes fatores podem acelerar o processo de diferenciação (Musarò, 2014).

Muitos fatores/agentes podem provocar injúria, influenciando em graus variados a estrutura tecidual do músculo esquelético, e no geral, podem envolver agentes mecânicos, térmicos e químicos. Alguns tipos de traumas mecânicos que são comuns em atletas durante suas atividades esportivas são as contusões, lacerações e as distensões musculares (Järvinen et al., 2005). Além disso, diversos tipos de miopatias musculares provocam intensa injúria muscular, tais como as distrofias musculares. Dentre estas desordens a mais conhecida forma é a distrofia muscular de Duchenne (DMD), onde ocorre uma mutação no gene da distrofina, uma proteína estrutural que liga o citoesqueleto intracelular com a matriz extracelular, protegendo o músculo de danos causados pela força mecânica criada durante as contrações musculares, logo, na DMD a falta da distrofina faz com que os músculos do indivíduo estejam em um constante ciclo de injúria e regeneração (Davies and Nowak, 2006).

Podemos dividir didaticamente o processo regenerativo em cinco fases inter-relacionadas a saber: degeneração (necrose); inflamação; regeneração propriamente dita; remodelamento e maturação/reparo funcional (Baoge et al., 2012; Järvinen et al., 2013).

Agudamente na fase de degeneração existe lesão do sarcolema, influxo de cálcio e intensa proteólise, apresentando amplos sinais de necrose com perda de continuidade das fibras musculares. Posteriormente na fase de inflamação há a presença de neutrófilos em períodos mais agudos (1-6h) seguidos de macrófagos de fenótipos M1 e M2 em períodos mais tardios (~48h), que são responsáveis pela fagocitose e digestão das miofibras necrosadas e pela secreção de citocinas que são capazes de iniciar a ativação das células satélite. Neste estágio o aspecto histológico, além do infiltrado inflamatório, apresenta espaços vazios e fibras hipercontraídas (Tidball, 2011).

Na fase da regeneração propriamente dita (4-10 dias) ocorre a proliferação e diferenciação das células satélite ativadas, mediadas pelos fatores MRFs, ocorrendo assim a formação de novas fibras ou a reparação das já existentes (Baoge et al., 2012). Durante esta fase a qualidade do microambiente tecidual também colabora para a eficiência do reparo da injúria. Neste sentido alguns autores demonstram a participação de células não musculares no processo de regeneração e manutenção do *pool* de células satélite, estas células podem residir no tecido muscular ou são recrutadas via circulação sanguínea, através de sinais provenientes do músculo lesionado. Como exemplo destes tipos celulares, podemos citar as células intersticiais e endoteliais e as chamadas *side populations cells* derivadas da medula óssea (Järvinen et al., 2013; Karalaki et al.; Musarò, 2014).

No fim do processo regenerativo propriamente dito ocorrem às fases de remodelamento (10-15 dias) e de maturação/reparo funcional (15-21 dias). Nestes estágios ocorre a angiogênese e restabelecimento da arquitetura tecidual normal através da ativação da matriz extracelular, que por sua vez produz diversos tipos de proteínas estruturais, como por exemplo colágeno, fibronectina, elastina e laminina, que serviram para estabilizar o tecido regenerado e guiar a formação de novas junções neuromusculares (Järvinen et al., 2013). Após aproximadamente duas semanas, em roedores, grande parte da forma e função muscular está restituída (Tedesco et al., 2010), já em humanos estas últimas fases de remodelamento e maturação podem levar até 3-6 meses dependendo do tipo e extensão da injúria (Baoge et al., 2012).

A proteína MuRF1 em conjunto com a sua homóloga MuRF2, além de desempenharem um papel na atrofia muscular, também são importantes na formação do sarcômero e diferenciação

miogênica (McElhinny et al., 2004). Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a ablação destes MuRFs prejudica a diferenciação das células satélites, levando a um déficit no processo de regeneração muscular em camundongos (Moriscot et al., 2019), demonstrando assim que MuRFs também desempenham um papel importante na regulação da regeneração muscular esquelética. Baseados nesse estudo, formulamos a **primeira hipótese** deste trabalho em que a expressão de MuRFs durante o processo de regeneração poderia assim ser permitida através da repressão de microRNAs que os teriam como alvos diretamente.

No presente trabalho, em nossos achados, o miR-29c, é capaz de inibir diretamente MuRF1, sugerindo que este microRNA é um potencial candidato a mitigar a perda de massa muscular durante quadros atroficos. Além disso, este mesmo microRNA é capaz de induzir um efeito hipertrófico com ganho de função em músculos de camundongos. Observamos também um aumento na atividade de células satélites, sugerindo que o efeito hipertrófico deste microRNA envolve a remodelamento tecidual com participação do processo miogênico.

1.2 Principais conceitos sobre os microRNAs

1.2.1 Biogênese e função dos microRNAs

Os microRNAs ou simplesmente miRs, foram originalmente descobertos durante estudos direcionados na biologia do desenvolvimento larval do nematódeo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). O lin-4 (do inglês lineage-deficient-4) foi o primeiro microRNA descoberto em 1993 pelos grupos de pesquisa de Ambros e Ruvkun, descrito como um gene não codificador de proteína, com capacidade de inibir diretamente o gene LIN-14, e desta forma, controlar os estágios de desenvolvimento larval deste organismo (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Somente a partir de 2001 a ampla comunidade científica voltou sua atenção para os microRNAs, que a partir de novos trabalhos, deixaram de ser peculiaridade de *C. elegans*, para serem reconhecidos como elementos regulatórios importantes, presentes em animais a plantas (Millar and Waterhouse, 2005).

Os microRNAs são uma classe de pequenos RNAs não-codificadores de proteínas com cerca de 22nt (nucleotídeos), que regulam genes alvo a nível pós-transcricional, reprimindo sua expressão através da complementariedade de bases na 3' UTR (3' Untranslated Region) do mRNA. De animais a plantas, os microRNAs estão envolvidos com praticamente todos os processos biológicos, como o desenvolvimento, proliferação, diferenciação e diversas repostas celulares

(David P Bartel, 2004). A biogênese dos microRNAs se inicia no núcleo. São transcritos pela RNA polimerase II em regiões intergênicas, de maneira independente ou em *clusters*, também podem ser co-transcritos a partir de exons, íntrons, snoRNAs (small nucleolar RNAs), tRNAs (RNA transportador) e long noncoding RNAs (lncRNAs) (Dey et al., 2014; Zhao and Srivastava, 2007).

Em sua via canônica de biogênese inicialmente um transcrito primário é produzido, o pri-miR, uma longa estrutura em forma de *stem-loop*, possuindo uma região com RNA dupla-fita com 33-35 pares de base (*stem*), um terminal em forma de alça (*loop*) e segmentos de fita simples de RNA (braços) em ambos os lados 5' e 3' (Figura 1). O processamento se inicia ainda no núcleo em que o complexo de endonucleases denominado Drosha/DGCR8 remove os braços de RNA formando o miRNA precursor (pré-miR) que tem cerca de 70nt em forma de grampo, que é exportado para o citoplasma através das proteínas carreadoras, Exportin-5 e Ran-GTP (Figura 1). Uma vez no citoplasma, o pré-miRNA é clivado pela enzima DICER em fragmentos de RNA dupla-fita com cerca de 22-30nt. Em seguida uma enzima com atividade helicase separa as duas fitas que são nomeadas de acordo com a extremidade (braço) do pré-miR que as originou: 3' = miR-3p (denominada fita guia) ou 5' = miR-5p (fita passageira, anteriormente chamada de miR*). Finalmente a fita de microRNA é então complexada com uma ribonucleoproteína chamada RISC (*RNA-induced silencing complex*). O complexo miR/RISC se liga ao mRNA alvo e dependendo do grau de complementariedade, promove sua degradação ou impede sua tradução (Goljanek-Whysall et al., 2012) (Figura 1).

No geral a fita guia, o miR-3p, é a fita complexada ao RISC, sendo a fita de maior participação nas funções regulatórias dos microRNAs, porém, a fita passageira miR-5p, algumas vezes também pode ser funcional, por exemplo, alguns estudos no contexto do câncer, sugerem que as duas fitas, guia e passageira, podem ser funcionais e participam de um mesmo evento celular (Mitra et al., 2015)

Figura 1. Desenho esquemático representando o processo canônico de biogênese dos microRNAs. Em resumo, os microRNAs são transcritos e podem ter origem em regiões gênicas ou intergênicas no DNA. O longo transcrito primário em forma de grampo, chamado **pri-miR**, é processado ainda no núcleo pela clivagem da **Drosha/DCGR8**, formando assim o **pre-miR**, que logo é exportado para o citoplasma através das **Exportin 5/ Ran**. A enzima **Dicer** cliva e isola as duas sequências de **microRNA maduro**, miR-3p (fita guia) e miR-5p (passageira), em seguida uma das fitas ou mesmo ambas, são reconhecidas pelas ribonucleoproteínas do complexo **RISC**. Um vez complexados **miR/RISC**, o miR pode se hibridizar ao mRNA alvo, exercendo neste, efeitos pós-transcricionais, em geral, **degradando** o alvo ou **inibindo sua tradução** (Goljanek-Whysall et al., 2012).

1.2.3 Principais mecanismos de regulação dos microRNAs

A complementariedade de um microRNA ao seu mRNA alvo é imperfeita, no entanto, uma região denominada *seed* (semente), entre o segundo e o oitavo nucleotídeo da extremidade 5' do microRNA é essencial para o reconhecimento dos alvos. As *seeds* podem gerar pareamentos perfeitos ou imperfeitos com os alvos, incluindo *mismatches* ou pareamentos G-U, no entanto é através dessa hibridização que o microRNA pode de maneira eficiente reconhecer e silenciar seus alvos através do complexo RISC. No geral, microRNAs com a mesma *seed*, são agrupados em uma mesma família e podem ter como alvo o mesmo grupo de mRNAs. Além disso, microRNAs de diferentes famílias podem ter como alvo o mesmo mRNA, constituindo em uma redundância funcional que possibilita uma complexa rede de regulação e cooperação entre diferentes microRNAs (Bartel, 2009).

Apesar da grande importância da hibridização da *seed*, outros elementos em *Cis* ou *Trans* podem também participar do reconhecimento do mRNA alvo, assim por exemplo, o pareamento do microRNA ao mRNA alvo pode ou não depender da presença de regiões ricas em nucleotídeos AU próximas ao *seed*. Outros fatores que podem influenciar é a proximidade do pareamento a sítios de ligação de outros microRNAs no mRNA alvo e também a proximidade ao códon de parada na 3' UTR do mRNA Grimson et al. (2007).

O mecanismo de inibição do microRNA ao seu mRNA alvo depende de como eles se hibridizam. Embora ainda não se tenha uma regra totalmente definida, se o pareamento é imperfeito o microRNA promove a inibição da tradução do mRNA alvo, e aqueles com pareamento perfeito promovem a degradação do mRNA alvo (Bartel, 2009), este último, é um mecanismo do qual também se valem os siRNAs (*small interfering RNAs*) ou RNAi (RNA de interferência), que foram descobertos primeiramente como um mecanismo de defesa em plantas (Hamilton and Baulcombe, 1999), e que em seguida foram tecnicamente desenhados e sintetizados para mRNAs alvos específicos para estudos funcionais em células animais (Elbashir et al., 2001).

A inibição da tradução por um microRNA, pode ser devido a: inibição dos ribossomos; redução da velocidade de elongação; competição pelo 5'CAP do mRNA alvo; desmontagem prematura dos ribossomos; proteólise prematura durante a fase de elongação. Já a inibição por meio de degradação do mRNA alvo pode acontecer pelos seguintes processos: deadenilação seguida por retirada do 5'CAP (*decapping*) ou clivagem do mRNA alvo (David P. Bartel, 2004).

A localização celular dos eventos de silenciamento gênico mediados pelos microRNAs, algumas vezes não estão dispersos pelo citoplasma, mas sim concentrados em áreas chamadas de corpúsculos de processamento de RNA (*P-bodies*), ou mesmo em regiões do retículo endoplasmático. Os componentes que fazem parte dos *P-bodies* podem ser modulados quanto à expressão e atividade, podendo assim ser uma das maneiras pela qual as células podem regular a atividade dos microRNAs (Liu et al., 2005).

Ao longo dos anos, com o desenvolvimento de novas técnicas e formas de análise, observou-se que os mecanismos de ação dos microRNAs podem ser ainda mais complexos, atuando até mesmo dentro do núcleo celular. Assim por exemplo, um microRNA pode promover o silenciamento gênico a nível epigenético, levando à metilação no promotor do gene alvo ou provocando modificações na cromatina (Younger and Corey, 2011). Curiosamente alguns autores relatam que os microRNAs podem, em um sentido contrário, aumentar a transcrição de um gene

alvo (Zhang et al., 2014) ou, no citoplasma, aumentar a eficiência de tradução (Vasudevan et al., 2007).

1.3 microRNAs na plasticidade muscular

1.3.1 microRNAs na miogênese e regeneração muscular

Grande atenção tem sido dada aos microRNAs em estudos no contexto do desenvolvimento e desordens do músculo cardíaco e esquelético (Chen et al., 2009; Nie et al., 2015). De fato, tem sido demonstrado que certos microRNAs regulam a expressão de Pax7 e MRFs durante o processo de regeneração, e ablações de alguns destes microRNAs podem perturbar este processo (Goljanek-Whysall et al., 2012). Entre os microRNAs capazes de regular a expressão de Pax7 e MRFs, um grupo em particular, especificamente e altamente expresso no músculo estriado, é chamado de myomiRs, compreendendo membros das famílias: miR1/206, miR-133, miR-208 e miR-499 (McCarthy, 2011).

Muitos desses myomiRs são expressos no músculo esquelético e cardíaco, com exceção do miR-206, que é expresso somente no músculo esquelético, e do miR-208a, que é expresso somente no coração (McCarthy, 2011). Os myomiRs, miR-208a, miR-208b e miR-499, em particular, tem um papel importante na identidade e composição metabólica dos tipos de fibras musculares (van Rooij et al., 2008).

No contexto da miogênese, os myomiRs mais estudados são os da família do miR-1/206 e miR-133, que são transcritos em um *cluster* no mesmo locus cromossômico, e exercem efeitos opostos na proliferação e diferenciação de mioblastos in vitro (Chen et al., 2006) e durante a regeneração muscular (Nakasa et al., 2010).

O miR-1 promove a diferenciação miogênica, reprimindo Pax7 por ter como alvo a histona deacetilase 4 (HDAC4), um repressor da transcrição de MRFs. O miR-206 também promove a diferenciação e tem como alvo Pax3/7, Urotropina, Fstl1, Pol α entre outros fatores implicados na inibição da diferenciação e promoção da proliferação das células satélite (Goljanek-Whysall et al., 2012b). O miR-133, por outro lado, impede a diferenciação e promove a proliferação celular reprimindo SRF (Serif Response Factor), que de uma maneira interessante, é um fator de transcrição para o próprio miR-133, formando assim um mecanismo de *feedback* negativo que equilibra a proliferação e a diferenciação de mioblastos (Liu et al., 2008).

Outro importante mecanismo de *feedback* negativo, envolve o circuito regulatório NF- κ B-YY1-miR-29 durante a diferenciação miogênica. O miR-29 promove a diferenciação inibindo fatores epigenéticos que induzem o silenciamento gênico de MyoD e MyoG, tendo como alvo os membros do complexo PcG, Ezh2 (*Enhancer of zeste homolog*), Rybp e YY1 (*Ying Yang1*), todos, fatores que reprimem a diferenciação miogênica. YY1, por sua vez, pode regular positivamente a expressão do próprio miR-29 formando um mecanismo de *feedback* entre estes elementos durante o processo de miogênese (Wang et al., 2008; Zhou et al., 2012). Além disso, o miR-29 também pode promover a diferenciação miogênica em células C2C12 reprimindo AKT3 em miotubos (Wei et al., 2013).

No contexto da regeneração muscular, Nakasa et al. (2010b), demonstraram que a superexpressão destes três miomiRs (miR-133, miR-1 e miR-206) em conjunto, podem acelerar o processo de regeneração. Outros autores demonstraram que o miR-206 além de promover a regeneração muscular pós-injúria, pode reduzir a progressão da distrofia muscular de Duchenne (DMD) em camundongos (Liu et al., 2012). No sentido de buscar novos alvos de microRNAs para o tratamento da DMD, Wu et al. (2015) descreveram o papel do miR-431, na otimização do processo regenerativo através da inibição de Pax-7. Além disso, Heller et al. (2017), demonstram que a superexpressão do miR-29c pode reduzir a formação de fibrose e, em conjunto com a superexpressão de uma micro-distrofina recombinante, pode restaurar a função muscular em camundongos DMD.

Em um outro recente estudo, animais com depleção do miR-155, têm um *atraso* no processo de regeneração e concomitante aumento de áreas fibróticas, demonstrando que este microRNA é essencial para a regulação do balanço entre macrófagos de fenótipo M1 e M2 e para a progressão do processo regenerativo (Nie et al., 2016).

1.3.2 microRNAs e modulação da massa muscular esquelética

Muitos microRNAs, incluindo os myomiRs, desempenham um importante papel na regulação do processo atrofico no músculo esquelético. Wada et al. (2011) demonstraram que MuRF1 e Atrogin-1 são alvos diretos do miR-23a, do qual reprime a tradução de ambos atrogenes, neste estudo também foi demonstrado que animais transgênicos para o miR-23a tem proteção a atrofia muscular causada por glicocorticoides. Outros estudos demonstram que o miR-23a tem um

efeito pró-hipertrófico na musculatura cardíaca (Lin et al., 2009) e sua expressão é reprimida na atrofia induzida por insuficiência renal (Wang et al., 2011a) e no tratamento com dexametasona, através de um mecanismo que envolve a repressão da atividade da calcineurina (Hudson et al., 2014b).

No entanto, este sugestivo efeito anti-atrófico do miR-23a é controverso. Wang et al. (2012), demonstram que o miR-23a inibe a diferenciação miogênica, através da inibição direta de diversas formas de miosina, além disso, o miR-23a tem como alvo direto PGC-1 α , que por sua vez é um fator importante para indução do processo de hipertrofia induzida pelo exercício físico (Safdar et al., 2009).

O miR-1 também exerce um papel importante no processo de atrofia, sua expressão aumenta durante a atrofia induzida com o tratamento de dexametasona, além de indiretamente aumentar a atividade de FoxO3, por ter como alvo direto a proteína de choque térmico HSP70 (*heat shock protein 70*) (Kukreti et al., 2013). Por outro lado, Hudson et al. (2014a) demonstram que o miR-182 pode atenuar a atrofia muscular induzida pelo tratamento com dexametasona *in vitro*, através da repressão direta de FoxO3. Em uma outra abordagem, Xu et al. (2012) além de demonstrarem a importância de FoxO1 na expressão de atrogenes na atrofia muscular na insuficiência renal, demonstraram também que a superexpressão do miR-486 neste modelo pode atenuar o quadro atrófico, reprimindo a atividade de FoxO1.

Em um trabalho recente, Liu et al. (2017) demonstraram que a superexpressão do miR-18a induz atrofia em miotubos através da inibição direta de IGF-1. Em um outro estudo, Li et al. (2017a) demonstram que o miR-29b, promove e é necessário na atrofia em diversos modelos *in vitro* e *in vivo*, através da repressão direta de IGF-1 e PI3K(p85).

No contexto da hipertrofia muscular, Clop et al. (2006), realizaram a primeira observação relacionando os microRNAs com o gene da miostatina. Neste estudo demonstraram que uma mutação na 3'UTR do mRNA da miostatina cria uma região de hibridização para o miR-206, e a subsequente inibição da miostatina é a responsável por fazer com que ovelhas da raça Texel, conhecidas pela qualidade de sua carne, adquirissem uma maior musculatura. Em um outro estudo, foi demonstrado que a miostatina, através de Smad3, regula negativamente o miR-486, este microRNA por sua vez, é necessário para inibição de PTEN, um repressor da ativação de AKT (Hitachi et al., 2014). Estes estudos claramente demonstram que os microRNAs tem um papel importante nos efeitos de regulação da massa muscular promovidos pela miostatina.

A dinâmica de expressão dos microRNAs é modificada em resposta ao processo hipertrófico induzido pelo estresse mecânico e exercício físico. Assim por exemplo, McCarthy and Esser (2006) utilizando um modelo de hipertrofia por sobrecarga mecânica no músculo de camundongos, mostraram que os myomiRs miR-1 e miR-133a são intensamente reprimidos. Em um outro trabalho, estes myomiRs também foram reprimidos em humanos após exercícios de resistência, implicando em maior atividade da via IGF1/AKT/mTOR (Drummond et al., 2008). Por outro lado, o padrão de expressão dos microRNAs irá depender também do tipo de estresse mecânico, assim como duração, por exemplo, a expressão do miR-1 e miR-133 é induzida durante 20 semanas de exercícios aeróbicos em humanos, e reprimida após este período (Nielsen et al., 2010).

Estimulados pelo importante papel dos microRNAs no remodelamento da massa muscular, no presente trabalho, foi desenvolvida uma análise *in silico*, construindo uma lista contendo os genes mais conhecidos na literatura por estarem envolvidos no controle da massa muscular esquelética, tanto na atrofia quanto na hipertrofia. Baseada nesta lista, foi feita uma classificação dos microRNAs que teriam o maior número de alvos preditos, e com isto foi postulada uma **segunda hipótese**, em que o miR-29c, um dos microRNAs com maior número de genes alvo, teria potencial de controlar a massa muscular esquelética.

2. CONCLUSÃO

Neste trabalho identificamos o miR-29c como um potencial regulador da massa muscular esquelética. A superexpressão do miR-29c, promoveu um aumento da massa com ganho de força no músculo esquelético de camundongos. Nossos dados também revelaram que MuRF1 é um alvo direto do miR-29c. O efeito hipertrófico do miR-29c no músculo, foi acompanhado de um remodelamento tecidual com aumento da ativação de células satélites e profunda modulação de genes atroficos. Além disso, a superexpressão do miR-29c aumentou a miogênese em células C2C12, incluindo o aumento do diâmetro de miotubos.

Estes achados mostram que a manipulação dos níveis do miR-29c pode ser útil como ferramenta terapêutica, visando a minimização da perda de massa muscular em quadros atroficos e também no aumento da massa muscular em indivíduos saudáveis, em especial idosos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander MS, Casar JC, Motohashi N, Vieira NM, Eisenberg I, Marshall JL, et al. MicroRNA-486-dependent modulation of DOCK3/PTEN/AKT signaling pathways improves muscular dystrophy-associated symptoms. *J Clin Invest* 2014;124:2651–67. doi:10.1172/JCI73579.

Antonio J, Gonyea WJ. Skeletal muscle fiber hyperplasia. *Med Sci Sports Exerc* 1993;25:1333–45.

Appell HJ. Muscular Atrophy Following Immobilisation: A Review. *Sport Med* 1990. doi:10.2165/00007256-199010010-00005.

Armstrong DD, Esser K a. Wnt/ β -catenin signaling activates growth-control genes during overload-induced skeletal muscle hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005. doi:10.1152/ajpcell.00093.2005.

Baldwin KM, Haddad F. Skeletal muscle plasticity: Cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, 2002. doi:10.1097/00002060-200211001-00006.

Bamman MM, Shipp JR, Jiang J, Gower BA, Hunter GR, Goodman A, et al. Mechanical load increases muscle IGF-I and androgen receptor mRNA concentrations in humans. *Am J Physiol Metab* 2001. doi:10.1152/ajpendo.2001.280.3.E383.

Bandyopadhyay S, Friedman RC, Marquez RT, Keck K, Kong B, Icardi MS, et al. Hepatitis C virus infection and hepatic stellate cell activation downregulate miR-29: miR-29 overexpression reduces hepatitis C viral abundance in culture. *J Infect Dis* 2011. doi:10.1093/infdis/jir186.

Baoge L, Van Den Steen E, Rimbaut S, Philips N, Witvrouw E, Almqvist KF, et al. Treatment of Skeletal Muscle Injury: A Review. *ISRN Orthop* 2012. doi:10.5402/2012/689012.

Baracos VE, Martin L, Korc M, Guttridge DC, Fearon KCH. Cancer-associated cachexia. *Nat Rev Dis Prim* 2018. doi:10.1038/nrdp.2017.105.

Barreiro E, Jaitovich A. Muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease: Molecular basis and potential therapeutic targets. *J Thorac Dis* 2018. doi:10.21037/jtd.2018.04.168.

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215–33. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–97.

Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 2004. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5.

Bazgir B, Fathi R, Valojerdi MR, Mozdziak P, Asgari A. Satellite cells contribution to exercise mediated muscle hypertrophy and repair. *Cell J* 2016. doi:10.22074/CELLJ.2016.4714.

Beauchemin M, Smith A, Yin VP. Dynamic microRNA-101a and Fosab expression controls zebrafish heart regeneration. *Development* 2015. doi:10.1242/dev.126649.

Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Metab* 2014;307:E469–84. doi:10.1152/ajpendo.00204.2014.

Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294:1704–8. doi:10.1126/science.1065874.

Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VKM, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal Muscle Atrophy. *Science* (80-) 2001;294:1704–8. doi:10.1126/science.1065874.

Bongers KS, Fox DK, Ebert SM, Kunkel SD, Dyle MC, Bullard SA, et al. Skeletal muscle denervation causes skeletal muscle atrophy through a pathway that involves both Gadd45a and HDAC4. *AJP Endocrinol Metab* 2013. doi:10.1152/ajpendo.00380.2013.

Boonyarom O, Inui K. Atrophy and hypertrophy of skeletal muscles: Structural and functional aspects. *Acta Physiol* 2006;188:77–89. doi:10.1111/j.1748-1716.2006.01613.x.

Booth FW. Effect of limb immobilization on skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1982;52:1113–8. doi:10.1152/jappl.1982.52.5.1113.

Borensztein M, Monnier P, Court F, Louault Y, Ripoche M-A, Tired L, et al. Myod and H19-Igf2 locus interactions are required for diaphragm formation in the mouse. *Development* 2013. doi:10.1242/dev.084665.

Bowen TS, Adams V, Werner S, Fischer T, Vinke P, Brogger MN, et al. Small-molecule inhibition of MuRF1 attenuates skeletal muscle atrophy and dysfunction in cardiac cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2017. doi:10.1002/jcsm.12233.

Bruggeman AR, Kamal AH, LeBlanc TW, Ma JD, Baracos VE, Roeland EJ. Cancer Cachexia: Beyond Weight Loss. *J Oncol Pract* 2016. doi:10.1200/JOP.2016.016832.

Callahan LA, Supinski GS. Sepsis-induced myopathy. *Crit. Care Med.*, 2009. doi:10.1097/CCM.0b013e3181b6e439.

Chakrabarty A, Tranguch S, Daikoku T, Jensen K, Furneaux H, Dey SK. MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci* 2007. doi:10.1073/pnas.0705917104.

Chan S, Head SI. Age- and gender-related changes in contractile properties of non-atrophied EDL muscle. *PLoS One* 2010;5. doi:10.1371/journal.pone.0012345.

Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004;84:209–38. doi:10.1152/physrev.00019.2003.

Chen J-F, Callis TE, Wang D-Z. microRNAs and muscle disorders. *J Cell Sci* 2009;122:13–20. doi:10.1242/jcs.041723.

Chen J-F, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2006;38:228–33. doi:10.1038/ng1725.

Chen J-F, Tao Y, Li J, Deng Z, Yan Z, Xiao X, et al. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J Cell Biol* 2010;190:867–79. doi:10.1083/jcb.200911036.

Chen JF, Tao Y, Li J, Deng Z, Yan Z, Xiao X, et al. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J Cell Biol* 2010.

doi:10.1083/jcb.200911036.

Chen Y, Melton DW, Gelfond JAL, McManus LM, Shireman PK. MiR-351 transiently increases during muscle regeneration and promotes progenitor cell proliferation and survival upon differentiation. *Physiol Genomics* 2012;44:1042–51. doi:10.1152/physiolgenomics.00052.2012.

Chen Y, Melton DW, Gelfond JAL, McManus LM, Shireman PK. MiR-351 transiently increases during muscle regeneration and promotes progenitor cell proliferation and survival upon differentiation. *Physiol Genomics* 2012. doi:10.1152/physiolgenomics.00052.2012.

Chikenji A, Ando H, Nariyama M, Suga T, Iida R, Gomi K. MyoD is regulated by the miR-29a-Tet1 pathway in C2C12 myoblast cells. *J Oral Sci* 2016;58:219–29. doi:10.2334/josnusd.15-0684.

Chromiak JA, Antonio J. *Skeletal Muscle Plasticity. Essentials Sport. Nutr. Study Guid.*, Totowa, NJ: Humana Press; 2008, p. 16–36. doi:10.1007/978-1-59745-302-8_2.

Chuang SY, Chang HY, Lee MS, Chia-Yu Chen R, Pan WH. Skeletal muscle mass and risk of death in an elderly population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014. doi:10.1016/j.numecd.2013.11.010.

Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibé B, et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet* 2006. doi:10.1038/ng1810.

Communications S, Training R. Progression models in resistance training for healthy adults. *Med Sci Sports Exerc* 2009;41:687–708. doi:10.1249/MSS.0b013e3181915670.

Cushing L, Kuang PP, Qian J, Shao F, Wu J, Little F, et al. miR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;45:287–94. doi:10.1165/rcmb.2010-0323OC.

Daikoku T, Hirota Y, Tranguch S, Joshi AR, DeMayo FJ, Lydon JP, et al. Conditional loss of uterine Pten unfaithfully and rapidly induces endometrial cancer in mice. *Cancer Res* 2008. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1274.

Daud AI, DeConti RC, Andrews S, Urbas P, Riker AI, Sondak VK, et al. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2008. doi:10.1200/JCO.2007.15.6794.

Davies KE, Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: Old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006. doi:10.1038/nrm2024.

Day CS, Buranapanitkit B, Riano FA, Tomaino MM, Somogyi G, Sotereanos DG, et al. Insulin growth factor-1 decreases muscle atrophy following denervation. *Microsurgery* 2002. doi:10.1002/micr.21742.

Dean DA, Machado-Aranda D, Blair-Parks K, Yeldandi A V., Young JL. Electroporation as a method for high-level nonviral gene transfer to the lung. *Gene Ther* 2003. doi:10.1038/sj.gt.3302053.

Deiuliis JA. MicroRNAs as regulators of metabolic disease: Pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *Int J Obes* 2016;40:88–101. doi:10.1038/ijo.2015.170.

Deschenes MR, Hurst TE, Ramser AE, Sherman EG. Presynaptic to postsynaptic relationships of the neuromuscular junction are held constant across age and muscle fiber type. *Dev Neurobiol* 2013. doi:10.1002/dneu.22095.

Dey BK, Pfeifer K, Dutta A. The H19 long noncoding RNA gives rise to microRNAs miR-675-3p and miR-675-5p to promote skeletal muscle differentiation and regeneration. *Genes Dev* 2014;28:491–501. doi:10.1101/gad.234419.113.

Donà M, Sandri M, Rossini K, Dell'Aica I, Podhorska-Okolow M, Carraro U. Functional in vivo gene transfer into the myofibers of adult skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2003. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.032.

Drummond MJ, McCarthy JJ, Fry CS, Esser KA, Rasmussen BB. Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. *AJP Endocrinol Metab* 2008. doi:10.1152/ajpendo.90562.2008.

Dudgeon W, Phillips K, Carson J, Brewer R, Durstine J, Hand G. Counteracting muscle wasting in HIV-infected individuals. *HIV Med* 2006;7:299–310. doi:10.1111/j.1468-1293.2006.00380.x.

Eddins MJ, Marblestone JG, Suresh Kumar KG, Leach CA, Sterner DE, Mattern MR, et al. Targeting the ubiquitin E3 ligase MuRF1 to inhibit muscle atrophy. *Cell Biochem Biophys* 2011;60:113–8. doi:10.1007/s12013-011-9175-7.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001. doi:10.1038/35078107.

Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 2008;452:896–9. doi:10.1038/nature06783.

Eriksson A, Lindström M, Carlsson L, Thornell LE. Hypertrophic muscle fibers with fissures in powerlifters; fiber splitting or defect regeneration? *Histochem Cell Biol* 2006;126:409–17. doi:10.1007/s00418-006-0176-3.

Fang J, Hao Q, Liu L, Li Y, Wu J, Huo X, et al. Epigenetic Changes Mediated by MicroRNA miR29 Activate Cyclooxygenase 2 and Lambda-1 Interferon Production during Viral Infection. *J Virol* 2012. doi:10.1128/JVI.06169-11.

Fernandez S, Risolino M, Mandia N, Talotta F, Soini Y, Incoronato M, et al. miR-340 inhibits tumor cell proliferation and induces apoptosis by targeting multiple negative regulators of p27 in non-small cell lung cancer n.d. doi:10.1038/onc.2014.267.

Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ. *Physiology of a Microgravity Environment* Invited Review: Microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2000. doi:10.1152/jappl.2000.89.2.823.

Frontera WR, Ochala J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Behav Genet* 2015. doi:10.1007/s00223-014-9915-y.

Gebert LFR, Rebhan MAE, Crivelli SEM, Denzler R, Stoffel M, Hall J. Miravirsin (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122. *Nucleic Acids Res* 2014. doi:10.1093/nar/gkt852.

Goljanek-Whysall K, Sweetman D, Münsterberg AE. microRNAs in skeletal muscle differentiation and disease. *Clin Sci (Lond)* 2012a;123:611–25. doi:10.1042/CS20110634.

Goljanek-Whysall K, Sweetman D, Münsterberg AE. microRNAs in skeletal muscle differentiation and disease. *Clin Sci (Lond)* 2012b;123:611–25. doi:10.1042/CS20110634.

Gollins H, McMahon J, Wells KE, Wells DJ. High-efficiency plasmid gene transfer into dystrophic muscle. *Gene Ther* 2003. doi:10.1038/sj.gt.3301927.

Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Pnas* 2001;98:14440–5. doi:10.1073/pnas.251.

Goodman CA, McNally RM, Hoffmann FM, Hornberger TA. Smad3 Induces Atrogin-1, Inhibits mTOR and Protein Synthesis, and Promotes Muscle Atrophy In Vivo. *Mol Endocrinol* 2013;27:1946–57. doi:10.1210/me.2013-1194.

Gransee HM, Mantilla CB, Sieck GC. Respiratory muscle plasticity. *Compr Physiol* 2012;2:1441–62. doi:10.1002/cphy.c110050.

Grimson A, Farh KKH, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Mol Cell* 2007;27:91–105. doi:10.1016/j.molcel.2007.06.017.

Von Haehling S, Steinbeck L, Doehner W, Springer J, Anker SD. Muscle wasting in heart failure: An overview. *Int J Biochem Cell Biol* 2013. doi:10.1016/j.biocel.2013.04.02.

Hameed M, Orrell RW, Cubbold M, Goldspink G, Harridge SDR. Expression of IGF-I splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise. *J Physiol* 2003. doi:10.1113/jphysiol.2002.032136.

Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* (80-) 1999. doi:10.1126/science.286.5441.950.

He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F. Overexpression of Micro Ribonucleic Acid 29, Highly Up-Regulated in Diabetic Rats, Leads to Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes. *Mol Endocrinol* 2007;21:2785–94. doi:10.1210/me.2007-0167.

Heller KN, Mendell JT, Mendell JR, Rodino-Klapac LR. MicroRNA-29 overexpression by adeno-associated virus suppresses fibrosis and restores muscle function in combination with micro-dystrophin. *JCI Insight* 2017;2:1–13. doi:10.1172/jci.insight.93309.

Herbst KL, Bhasin S. Testosterone action on skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004. doi:10.1097/00075197-200405000-00006.

Hitachi K, Nakatani M, Tsuchida K. Myostatin signaling regulates Akt activity via the regulation of miR-486 expression. *Int J Biochem Cell Biol* 2014. doi:10.1016/j.biocel.2013.12.003.

Hoppeler H, Lϑthi P, Claassen H, Weibel ER, Howald H. The ultrastructure of the normal human skeletal muscle. *Pflϑgers Arch Eur J Physiol* 1973;344:217–32. doi:10.1007/BF00588462.

Hudson MB, Rahnert JA, Zheng B, Woodworth-Hobbs ME, Franch HA, Russ Price S. miR-182 attenuates atrophy-related gene expression by targeting FoxO3 in skeletal muscle. *AJP Cell Physiol* 2014a. doi:10.1152/ajpcell.00395.2013.

Hudson MB, Woodworth-Hobbs ME, Zheng B, Rahnert JA, Blount MA, Gooch JL, et al. miR-23a is decreased during muscle atrophy by a mechanism that includes calcineurin signaling and exosome-mediated export. *AJP Cell Physiol* 2014b. doi:10.1152/ajpcell.00266.2013.

Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* (80-) 2007. doi:10.1126/science.1136235.

Isaka Y, Imai E. Electroporation-mediated gene therapy. *Expert Opin Drug Deliv* 2007. doi:10.1517/17425247.4.5.561.

Jackman RW. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *AJP Cell Physiol* 2004. doi:10.1152/ajpcell.00579.2003.

Järvinen TAH, Järvinen M, Kalimo H. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscles Ligaments Tendons J* 2013;3:337–45. doi:10.11138/mltj/2013.3.4.337.

Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: Biology and treatment. *Am J Sports Med* 2005. doi:10.1177/0363546505274714.

Jiang H, Zhang G, Wu JH, Jiang CP. Diverse roles of miR-29 in cancer (Review). *Oncol Rep* 2014;31:1509–16. doi:10.3892/or.2014.3036.

Karalaki M, Fili S, Philippou A, Koutsilieris M. Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In Vivo* 23:779–96.

Khalil R. Ubiquitin-Proteasome Pathway and Muscle Atrophy, 2018, p. 235–48. doi:10.1007/978-981-13-1435-3_10.

Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol Genomics* 2012;44:237–44. doi:10.1152/physiolgenomics.00141.2011.

Kukreti H, Amuthavalli K, Harikumar A, Sathiyamoorthy S, Feng PZ, Anantharaj R, et al. Muscle-specific MicroRNA1 (miR1) targets heat shock protein 70 (HSP70) during dexamethasone-mediated atrophy. *J Biol Chem* 2013. doi:10.1074/jbc.M112.390369.

Kumai Y, Ito T, Miyamaru S, Yumoto E. Modulation of MyoD- and Ki-67-positive satellite cells in the short-term denervated rat thyroarytenoid muscle. *Laryngoscope* 2007. doi:10.1097/MLG.0b013e318133a13c.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970. doi:10.1038/227680a0.

Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* (80-) 2010;327:198–201. doi:10.1126/science.1178178.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y.

Lessard SJ, MacDonald TL, Pathak P, Han MS, Coffey VG, Edge J, et al. JNK regulates muscle remodeling via myostatin/SMAD inhibition. *Nat Commun* 2018. doi:10.1038/s41467-018-05439-3.

Li D, Zhan S, Wang Y, Wang L, Zhong T, Li L, et al. Role of microRNA-101a in the regulation of goat skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation. *Gene* 2015;572:198–204. doi:10.1016/j.gene.2015.07.010.

Li J-T, Zhao W, Li D-D, Feng J, Ba G, Song T-Z, et al. miR-101a targeting EZH2 promotes the differentiation of goat skeletal muscle satellite cells. *Yi Chuan = Hered* 2017;39:828–36. doi:10.16288/j.ycz.16-403.

Li J, Chan MC, Yu Y, Bei Y, Chen P, Zhou Q, et al. MiR-29b contributes to multiple types of muscle atrophy. *Nat Commun* 2017;8. doi:10.1038/ncomms15201.

Li L, Sarver AL, Alamgir S, Subramanian S. Downregulation of microRNAs miR-1, -206 and -29 stabilizes PAX3 and CCND2 expression in rhabdomyosarcoma. *Lab Invest* 2012;92:571–83. doi:10.1038/labinvest.2012.10.

Lin Z, Murtaza I, Wang K, Jiao J, Gao J, Li P-F. miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci* 2009. doi:10.1073/pnas.0811371106.

Liu C, Wang M, Chen M, Zhang K, Gu L, Li Q, et al. miR-18a induces myotubes atrophy by down-regulating IgfI. *Int J Biochem Cell Biol* 2017. doi:10.1016/j.biocel.2017.07.020.

Liu CZ, Li JJ, Su JM, Jiao T, Gou LJ, He XD, et al. Expression of microRNA-29b2-c cluster is positively regulated by MyoD in L6 Cells. *Chinese Med Sci J* 2013;28:140–6. doi:10.1016/S1001-9294(13)60039-5.

Liu J, Rivas F V., Wohlschlegel J, Yates JR, Parker R, Hannon GJ. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* 2005. doi:10.1038/ncb1333.

Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev* 2008;22:3242–54. doi:10.1101/gad.1738708.

Liu N, Williams AH, Maxeiner JM, Bezprozvannaya S, Shelton JM, Richardson JA, et al. MicroRNA-206 promotes skeletal muscle regeneration and delays progression of Duchenne muscular dystrophy in mice. *J Clin Invest* 2012. doi:10.1172/JCI62656.

Lu YF, Liu Y, Fu WM, Xu J, Wang B, Sun YX, et al. Long noncoding RNA H19 accelerates tenogenic differentiation & promotes tendon healing through targeting miR-29b-3p & activating TGF- β 1 signaling. *FASEB J* 2017. doi:10.1096/fj.201600722R.

Lynch GS, Ryall JG. Role of α -Adrenoceptor Signaling in Skeletal Muscle: Implications for Muscle Wasting and Disease. *Physiol Rev* 2008. doi:10.1152/physrev.00028.2007.

MacDougall JD, Sale DG, Elder GCB, Sutton JR. Muscle ultrastructural characteristics of elite powerlifters and bodybuilders. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1982. doi:10.1007/BF00421171.

Massart J, Sjögren RJO, Lundell LS, Mudry JM, Franck N, O’Gorman DJ, et al. Altered miR-29 expression in type 2 diabetes influences glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. *Diabetes* 2017;66:1807–18. doi:10.2337/db17-0141.

McCarthy JJ. The myomiR network in skeletal muscle plasticity. *Exerc Sport Sci Rev* 2011. doi:10.1097/JES.0b013e31821c01e1.

McCarthy JJ, Esser KA. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 2006. doi:10.1152/jappphysiol.00932.2006.

McCarthy JJ, Mula J, Miyazaki M, Erfani R, Garrison K, Farooqui AB, et al. Effective fiber hypertrophy in

satellite cell-depleted skeletal muscle. *Development* 2011;138:3657–66. doi:10.1242/dev.068858.

McElhinny AS, Perry CN, Witt CC, Labeit S, Gregorio CC. Muscle-specific RING finger-2 (MURF-2) is important for microtubule, intermediate filament and sarcomeric M-line maintenance in striated muscle development. *J Cell Sci* 2004;117:3175–88. doi:10.1242/jcs.01158.

McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF- κ B-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 2006. doi:10.1002/jcp.20757.

McGlory C, Phillips SM. Exercise and the Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, vol. 135, 2015, p. 153–73. doi:10.1016/bs.pmbts.2015.06.018.

McMahon JM, Signori E, Wells KE, Fazio VM, Wells DJ. Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase -- increased expression with reduced muscle damage. *Gene Ther* 2001;8:1264–70. doi:10.1038/sj.gt.3301522.

McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* 1997. doi:10.1038/387083a0.

Mei T, Liu Y, Wang J, Zhang Y. miR-340-5p: A potential direct regulator of Nrf2 expression in the post-exercise skeletal muscle of mice. *Mol Med Rep* 2018. doi:10.3892/mmr.2018.9762.

Millar AA, Waterhouse PM. Plant and animal microRNAs: Similarities and differences. *Funct Integr Genomics* 2005. doi:10.1007/s10142-005-0145-2.

Mitra R, Lin CC, Eischen CM, Bandyopadhyay S, Zhao Z. Concordant dysregulation of miR-5p and miR-3p arms of the same precursor microRNA may be a mechanism in inducing cell proliferation and tumorigenesis: a lung cancer study. *RNA* 2015. doi:10.1261/rna.048132.114.

Molnar MJ, Gilbert R, Lu Y, Liu AB, Guo A, Larochelle N, et al. Factors influencing the efficacy, longevity, and safety of electroporation-assisted plasmid-based gene transfer into mouse muscles. *Mol Ther* 2004. doi:10.1016/j.ymthe.2004.06.642.

Moriscot AS, Baptista IL, Silva WJ, Silvestre JG, Adams V, Gasch A, et al. MuRF1 and MuRF2 are key players in skeletal muscle regeneration involving myogenic deficit and deregulation of the chromatin-remodeling complex. *J Cachexia, Sarcopenia Muscle - Rapid Commun* 2019.

Moss FP, Leblond CP. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat Rec* 1971. doi:10.1002/ar.1091700405.

Mott JL, Kurita S, Cazanave SC, Bronk SF, Werneburg NW, Fernandez-Zapico ME. Transcriptional suppression of mir-29b-1/mir-29a promoter by c-Myc, hedgehog, and NF-kappaB. *J Cell Biochem* 2010;110:1155–64. doi:10.1002/jcb.22630.

Musarò A. The Basis of Muscle Regeneration. *Adv Biol* 2014;2014:16. doi:10.1155/2014/612471.

Musarò A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, et al. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet* 2001. doi:10.1038/84839.

Nakasa T, Ishikawa M, Shi M, Shibuya H, Adachi N, Ochi M. Acceleration of muscle regeneration by local injection of muscle-specific microRNAs in rat skeletal muscle injury model. *J Cell Mol Med* 2010;14:2495–505. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00898.x.

Navegantes LCC, Migliorini RH, do Carmo Kettelhut I. Adrenergic control of protein metabolism in skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:281–6. doi:10.1097/00075197-200205000-00007.

Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1982. doi:10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x.

Newman AB, Kupelian V, Visser M, Simonsick EM, Goodpaster BH, Kritchevsky SB, et al. Strength, but not muscle mass, is associated with mortality in the health, aging and body composition study cohort. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* 2006. doi:10.1093/gerona/61.1.72.

Nie M, Deng ZL, Liu J, Wang DZ. Noncoding RNAs, emerging regulators of skeletal muscle development and diseases. *Biomed Res Int* 2015;2015. doi:10.1155/2015/676575.

Nie M, Liu J, Yang Q, Seok HY, Hu X, Deng ZL, et al. MicroRNA-155 facilitates skeletal muscle regeneration by balancing pro- and anti-inflammatory macrophages. *Cell Death Dis* 2016. doi:10.1038/cddis.2016.165.

Nielsen S, Scheele C, Yfanti C, Åkerström T, Nielsen AR, Pedersen BK, et al. Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. *J Physiol* 2010. doi:10.1113/jphysiol.2010.189860.

Nishimune H, Stanford JA, Mori Y. Role of exercise in maintaining the integrity of the neuromuscular junction. *Muscle and Nerve* 2014. doi:10.1002/mus.24095.

Okada N, Lin CP, Ribeiro MC, Biton A, Lai G, He X, et al. A positive feedback between p53 and miR-34 miRNAs mediates tumor suppression. *Genes Dev* 2014. doi:10.1101/gad.233585.113.

Ortega PAS, Saulle I, Mercurio V, Ibba SV, Lori EM, Fenizia C, et al. The interleukin 21 (IL 21)/microRNA-29 (miR-29) axis is associated with natural resistance to HIV-1 infection. *AIDS* 2018;32:1. doi:10.1097/QAD.0000000000001938.

Pan Z, Sun X, Shan H, Wang N, Wang J, Ren J, et al. MicroRNA-101 inhibited postinfarct cardiac fibrosis and improved left ventricular compliance via the FBJ osteosarcoma oncogene/transforming growth factor- β 1 pathway. *Circulation* 2012. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.094524.

Paul PK, Bhatnagar S, Mishra V, Srivastava S, Darnay BG, Choi Y, et al. The E3 Ubiquitin Ligase TRAF6 Intercedes in Starvation-Induced Skeletal Muscle Atrophy through Multiple Mechanisms 2012. doi:10.1128/MCB.06351-11.

Pereira MG, Baptista IL, Carlassara EOC, Moriscot AS, Aoki MS, Miyabara EH. Leucine supplementation improves skeletal muscle regeneration after cryolesion in rats. *PLoS One* 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0085283.

Porporato PE. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome 2016;5:200. doi:10.1038/oncsis.2016.3.

Porter JD, Baker RS, Ragusa RJ, Brueckner JK. Extraocular muscles: Basic and clinical aspects of structure

and function. *Surv Ophthalmol* 1995. doi:10.1016/S0039-6257(05)80055-4.

Pratt SJP, Valencia AP, Le GK, Shah SB, Lovering RM. Pre- and postsynaptic changes in the neuromuscular junction in dystrophic mice. *Front Physiol* 2015. doi:10.3389/fphys.2015.00252.

Richards RB, Passmore IK, Dempsey EF. Skeletal muscle pathology in ovine congenital progressive muscular dystrophy. 1. Histopathology and histochemistry. *Acta Neuropathol* 1988;77:161–7.

Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994. doi:10.1016/S0092-8674(94)90462-6.

Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* 2001. doi:10.1038/ncb1101-1009.

van Rooij E, Liu N, Olson EN. MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet* 2008;24:159–66. doi:10.1016/j.tig.2008.01.007.

van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell* 2009;17:662–73. doi:10.1016/j.devcel.2009.10.013.

Rowan SL, Rygiel K, Purves-Smith FM, Solbak NM, Turnbull DM, Hepple RT. Denervation causes fiber atrophy and myosin heavy chain co-expression in senescent skeletal muscle. *PLoS One* 2012. doi:10.1371/journal.pone.0029082.

Rowland LA, Bal NC, Periasamy M. The role of skeletal-muscle-based thermogenic mechanisms in vertebrate endothermy. *Biol Rev* 2015. doi:10.1111/brv.12157.

Ruas JL, White JP, Rao RR, Kleiner S, Brannan KT, Harrison BC, et al. A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell* 2012. doi:10.1016/j.cell.2012.10.050.

Rudolf A, Schirwis E, Giordani L, Parisi A, Lepper C, Taketo MM, et al. β -Catenin Activation in Muscle Progenitor Cells Regulates Tissue Repair. *Cell Rep* 2016. doi:10.1016/j.celrep.2016.04.022.

Rudolf R, Bogomolovas J, Strack S, Choi KR, Khan MM, Wagner A, et al. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor turnover by MuRF1 connects muscle activity to endo/lysosomal and atrophy pathways. *Age (Omaha)* 2013. doi:10.1007/s11357-012-9468-9.

Safdar A, Abadi A, Akhtar M, Hettinga BP, Tarnopolsky MA. miRNA in the regulation of skeletal muscle adaptation to acute endurance exercise in C57Bl/6J male mice. *PLoS One* 2009. doi:10.1371/journal.pone.0005610.

Sakuma K, Yamaguchi A. The functional role of calcineurin in hypertrophy, regeneration, and disorders of skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol* 2010. doi:10.1155/2010/721219.

Sambasivan R, Yao R, Kissenpfennig A, Van Wittenberghe L, Paldi A, Gayraud-Morel B, et al. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development* 2011;138:4333–4333. doi:10.1242/dev.073601.

Sandri M. Signaling in Muscle Atrophy and Hypertrophy. *Physiology* 2008.

doi:10.1152/physiol.00041.2007.

Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 2004. doi:10.1016/S0092-8674(04)00400-3.

Schakman O, Kalista S, Barbé C, Loumaye A, Thissen JP. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *Int J Biochem Cell Biol* 2013. doi:10.1016/j.biocel.2013.05.036.

Schoenfeld BJ. The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. *J Strength Cond Res* 2010;24:2857–72. doi:10.1519/JSC.0b013e3181e840f3.

Schols AMWJ, Slangen J, Volovics L, Wouters EFM. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998. doi:10.1164/ajrccm.157.6.9705017.

Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, et al. Myostatin Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrophy in a Child. *N Engl J Med* 2004. doi:10.1056/NEJMoa040933.

Schwartz MS, Sargeant M, Swash M. Longitudinal fibre splitting in neurogenic muscular disorders-its relation to the pathogenesis of “myopathic” change. *Brain* 1976;99:617–36. doi:10.1093/brain/99.4.617.

Shi S, Chen X, Liu H, Yu K, Bao Y, Chai J, et al. LGR5 acts as a target of miR-340-5p in the suppression of cell progression and drug resistance in breast cancer via Wnt/ β -catenin pathway. *Gene* 2019;683:47–53. doi:10.1016/j.gene.2018.10.014.

Soares AG, Aoki MS, Miyabara EH, DeLuca CV, Ono HY, Gomes MD, et al. Ubiquitin-ligase and deubiquitinating gene expression in stretched rat skeletal muscle. *Muscle and Nerve* 2007;36:685–93. doi:10.1002/mus.20866.

De Spiegeleer A, Petrovic M, Boeckxstaens P, Van Den Noortgate N. Treating sarcopenia in clinical practice: where are we now? *Acta Clin Belgica Int J Clin Lab Med* 2016. doi:10.1080/17843286.2016.1168064.

Tanaka T, Haneda S, Imakawa K, Sakai S, Nagaoka K. A microRNA, miR-101a, controls mammary gland development by regulating cyclooxygenase-2 expression. *Differentiation* 2009. doi:10.1016/j.diff.2008.10.001.

Tando T, Hirayama A, Furukawa M, Sato Y, Kobayashi T, Funayama A, et al. Smad2/3 proteins are required for immobilization-induced skeletal muscle atrophy. *J Biol Chem* 2016. doi:10.1074/jbc.M115.680579.

Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest* 2010;120:11–9. doi:10.1172/JCI40373.

Tidball JG. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr Physiol* 2011;1:2029–62. doi:10.1002/cphy.c100092.

Toigo M, Boutellier U. New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. *Eur J Appl Physiol* 2006. doi:10.1007/s00421-006-0238-1.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 1979.

doi:10.1073/pnas.76.9.4350.

Tumaneng K, Schlegelmilch K, Russell RC, Yimlamai D, Basnet H, Mahadevan N, et al. YAP mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)K–TOR pathways by suppressing PTEN via miR-29. *Nat Cell Biol* 2012;14:1322–9. doi:10.1038/ncb2615.

Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B, et al. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* (80-) 2008. doi:10.1126/science.1165395.

Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: MicroRNAs can up-regulate translation. *Science* (80-) 2007. doi:10.1126/science.1149460.

Verma AK, Garg A, Xu D, Bruner M, Fazel-Rezai R, Blaber AP, et al. Skeletal Muscle Pump Drives Control of Cardiovascular and Postural Systems. *Sci Rep* 2017. doi:10.1038/srep45301.

Verma M, Fitzpatrick KR, McLoon LK. Extraocular Muscle Repair and Regeneration. *Curr Ophthalmol Rep* 2017;5:207–15. doi:10.1007/s40135-017-0141-4.

Wada S, Kato Y, Okutsu M, Miyaki S, Suzuki K, Yan Z, et al. Translational suppression of atrophic regulators by MicroRNA-23a integrates resistance to skeletal muscle atrophy. *J Biol Chem* 2011;286:38456–65. doi:10.1074/jbc.M111.271270.

Walsh NP, Blannin AK, Robson PJ, Gleeson M. Glutamine, exercise and immune function: Links and possible mechanisms. *Sport Med* 1998. doi:10.2165/00007256-199826030-00004.

Wang H, Garzon R, Sun H, Ladner KJ, Singh R, Dahlman J, et al. NF- κ B-YY1-miR-29 Regulatory Circuitry in Skeletal Myogenesis and Rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell* 2008;14:369–81. doi:10.1016/j.ccr.2008.10.006.

Wang HJ, Ruan HJ, He XJ, Ma YY, Jiang XT, Xia YJ, et al. MicroRNA-101 is down-regulated in gastric cancer and involved in cell migration and invasion. *Eur J Cancer* 2010. doi:10.1016/j.ejca.2010.05.012.

Wang L, Chen X, Zheng Y, Li F, Lu Z, Chen C, et al. MiR-23a inhibits myogenic differentiation through down regulation of fast myosin heavy chain isoforms. *Exp Cell Res* 2012. doi:10.1016/j.yexcr.2012.06.018.

Wang L, Zhou L, Jiang P, Lu L, Chen X, Lan H, et al. Loss of miR-29 in myoblasts contributes to dystrophic muscle pathogenesis. *Mol Ther* 2012;20:1222–33. doi:10.1038/mt.2012.35.

Wang XH, Hu Z, Klein JD, Zhang L, Fang F, Mitch WE. Decreased miR-29 Suppresses Myogenesis in CKD. *J Am Soc Nephrol* 2011. doi:10.1681/ASN.2010121278.

Wang XH, Mitch WE. Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease 2014. doi:10.1038/nrneph.2014.112.

Wei W, He H-B, Zhang W-Y, Zhang H-X, Bai J-B, Liu H-Z, et al. miR-29 targets Akt3 to reduce proliferation and facilitate differentiation of myoblasts in skeletal muscle development. *Cell Death Dis* 2013;4:e668. doi:10.1038/cddis.2013.184.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993. doi:10.1016/0092-8674(93)90530-4.

Wilkinson DJ, Piasecki M, Atherton PJ. The age-related loss of skeletal muscle mass and function: Measurement and physiology of muscle fibre atrophy and muscle fibre loss in humans. *Ageing Res Rev* 2018;47:123. doi:10.1016/J.ARR.2018.07.005.

Williams PE, Goldspink G. Longitudinal Growth of Striated Muscle Fibres. *J Cell Sci* 1971;9:751–67. doi:10.2307/1934593.

Wilson MH, Deschenes MR. The neuromuscular junction: Anatomical features and adaptations to various forms of increased, or decreased neuromuscular activity. *Int J Neurosci* 2005. doi:10.1080/00207450590882172.

Winbanks CE, Wang B, Beyer C, Koh P, White L, Kantharidis P, et al. TGF- β regulates miR-206 and miR-29 to control myogenic differentiation through regulation of HDAC4. *J Biol Chem* 2011;286:13805–14. doi:10.1074/jbc.M110.192625.

Wing SS, Lecker SH, Jagoe RT. Proteolysis in illness-associated skeletal muscle atrophy: from pathways to networks. *Crit Rev Clin Lab Sci* 48:49–70. doi:10.3109/10408363.2011.586171.

Wolfe RR. The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am J Clin Nutr* 2006. doi:10.1093/ajcn/84.3.475.

Wu C-L, Cornwell EW, Jackman RW, Kandarian SC. NF- κ B but not FoxO sites in the MuRF1 promoter are required for transcriptional activation in disuse muscle atrophy. *AJP Cell Physiol* 2014. doi:10.1152/ajpcell.00361.2013.

Wu R, Li H, Zhai L, Zou X, Meng J, Zhong R, et al. MicroRNA-431 accelerates muscle regeneration and ameliorates muscular dystrophy by targeting Pax7 in mice. *Nat Commun* 2015. doi:10.1038/ncomms8713.

Xie L, Chen Z, Liu H, Guan L, Wang Z, Li W. Effects of miR-340 on hepatocellular carcinoma by targeting the DcR3 gene. *Dig Liver Dis* 2018;50:291–6. doi:10.1016/j.dld.2017.10.024.

Xu J, Li R, Workeneh B, Dong Y, Wang X, Hu Z. Transcription factor FoxO1, the dominant mediator of muscle wasting in chronic kidney disease, is inhibited by microRNA-486. *Kidney Int* 2012. doi:10.1038/ki.2012.84.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 2012;13:134. doi:10.1186/1471-2105-13-134.

Younger ST, Corey DR. Transcriptional gene silencing in mammalian cells by miRNA mimics that target gene promoters. *Nucleic Acids Res* 2011. doi:10.1093/nar/gkr155.

Zhang P, Chen X, Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Med Hypotheses* 2007;69:310–21. doi:10.1016/j.mehy.2006.11.043.

Zhang Y, Fan M, Geng G, Liu B, Huang Z, Luo H, et al. A novel HIV-1-encoded microRNA enhances its viral replication by targeting the TATA box region. *Retrovirology* 2014. doi:10.1186/1742-4690-11-23.

Zhao X, Wang K, Liao Y, Zeng Q, Li Y, Hu F, et al. MicroRNA-101a inhibits cardiac fibrosis induced by hypoxia via targeting TGF β RI on cardiac fibroblasts. *Cell Physiol Biochem* 2015. doi:10.1159/000369689.

Zhao Y, Srivastava D. A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci* 2007;32:189–

97. doi:10.1016/j.tibs.2007.02.006.

Zhou L, Wang L, Lu L, Jiang P, Sun H, Wang H. A novel target of microRNA-29, Ring1 and YY1-binding protein (Rybp), negatively regulates skeletal myogenesis. *J Biol Chem* 2012;287:25255–65. doi:10.1074/jbc.M112.357053.

Zhou Y, Shiok TC, Richards AM, Wang P. MicroRNA-101a suppresses fibrotic programming in isolated cardiac fibroblasts and in vivo fibrosis following trans-aortic constriction. *J Mol Cell Cardiol* 2018. doi:10.1016/j.yjmcc.2018.07.251.