

**MIRELLA BENTO JEREZ**

**Efeitos da superexpressão da sequência  
mimética do mir-101a na regeneração  
muscular esquelética**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

São Paulo  
2022

**MIRELLA BENTO JEREZ**

**Efeitos da super expressão da sequência  
mimética do mir-101a na regeneração  
muscular esquelética**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais.

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot.

Versão original.

São Paulo  
2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Bento Jerez, Mirella  
Efeitos da superexpressão da sequência mimética  
do mir-101a na regeneração muscular esquelética /  
Mirella Bento Jerez; orientador Anselmo Sigari  
Moriscot. -- São Paulo, 2022.  
79 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Músculo Esquelético. 2. Regeneração. 3.  
MicroRNA. 4. miR-101a. 5. Fibrose. I. Sigari  
Moriscot, Anselmo , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Mirella Bento Jerez

Título da Dissertação/Tese: EFEITOS DA SUPEREXPRESSÃO DA SEQUÊNCIA MIMÉTICA DO MIR-101A NA REGENERAÇÃO MUSCULAR ESQUELÉTICA

Orientador: Anselmo Sigari Moriscot

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

(    ) **Aprovado(a)**                      (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

São Paulo, 25 de maio de 2022  
CEUA N 9910290318

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Anselmo Sigari Moriscot  
Área: Anatomia

Título da proposta: "EFEITOS DA EXPRESSÃO DO miR-101a NA REGULAÇÃO DA MASSA MUSCULAR ESQUELÉTICA".

**Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais ICB** (ID 002837)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo), no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Final (versão de 18/maio/2022) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Os objetivos propostos foram cumpridos? Sim 2. Todas as amostras obtidas foram utilizadas? Em caso negativo, informe quais amostras permanecem armazenadas. Sim 3. O estudo, ou parte dele, já foi apresentado em congresso, publicado na forma de monografia, dissertação, tese e/ou periódico científico ou gerou alguma patente? Se afirmativo, anexar cópia da primeira página das publicações ou número de patentes derivadas do projeto aprovado pela CEUA. Não 4. Ocorreram problemas relativos ao uso de animais durante a execução do projeto? Em caso afirmativo, descreva o acontecimento e informe quais as providências tomadas para evitar que haja reincidência do problema. Não 5. Algum aluno declarou escusa de consciência à experimentação animal, como previsto no artigo 39 da Lei Estadual nº 11.977/2005, durante a vigência do projeto? Em caso afirmativo, anexar documentação comprobatória do pedido e a atividade alternativa. Não 6. O estudo envolve organismos geneticamente modificados? Anexar documentação comprobatória da extensão do Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) para atividades de pesquisa em regime de contenção com OGM da classe de risco indicada na proposta, caso a documentação não tenha sido anexada na proposta original. Não 7. Cite as principais conclusões obtidas com o projeto, destacando sua contribuição para a saúde, bem-estar humano/animal, melhoria da qualidade de vida ou melhoria do meio ambiente (máximo de 100 palavras). Através de nossos resultados, podemos concluir que ao usar um modelo de superexpressão do miR-101a, a arquitetura tecidual do músculo esquelético é modificada em uma fase aguda (transitória) e que esse evento é marcado por um forte aumento de células inflamatórias. Podemos articular também que, a superexpressão do miR-101a pode adquirir um efeito anti-fibrótico no músculo esquelético em fase de regeneração, frente à um estímulo lesivo. Porém, o efeito da superexpressão do miR-101a no músculo esquelético com foco na fibrose ainda não foi estudado e esperamos com esse trabalho poder ajudar à esclarecer o efeito desse miRNA na regeneração do tecido muscular."

Comentário da CEUA: ""



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus.

Agradeço ao meu orientador, Anselmo Sigari Moriscot pelo aprendizado, profissionalismo, confiança, paciência e respeito.

Ao meu esposo, Nicolás Augusto Jerez, por todo amor, cuidado, carinho, incentivo e compreensão. Obrigada por estar comigo nesses longos e difíceis 4 anos de doutorado e muito obrigada por não me deixar desistir todas as vezes que eu gostaria. Você é tudo para mim!

Agradeço aos meus pais, onde deposito todo carinho do mundo. Minha mãe Marlene Ribeiro e meu pai Waldir Bento. Agradeço também às minhas irmãs e cunhados, Gabriela e Rodrigo; Izabella e Fernando; e Rafaella. Muito obrigada pela paciência e apoio vindos de todos vocês. Obrigada por acreditarem em mim e não duvidarem, mesmo quando tudo parecia uma loucura!

Agradecimento especial à minha sobrinha Luiza, de onde surgiram diversas alegrias e vontade de continuar para que um dia eu seja um exemplo para você.

À minha amada e enorme família. Minha tia Sibeli, minha sogra Dona Célia, meu sogro Seu José, meu cunhado Flávio e minha cunhada Jô. Obrigada por não duvidarem de mim.

À minha tia, Mariom Carmo por todo incentivo aos estudos, desde sempre e mesmo de longe. Obrigada por ser minha inspiração.

À todos os amigos mais próximos, pela paciência, compreensão e incentivo. Principalmente por todas as noites que eu não pude sair porque precisava estudar. Obrigada pela paciência!

Agradeço às Master Beauty's: Creicielly Brunelly, Cristiane Pereira, Karina Nakamura, Laís Bezerra e Natália Lopez, por dividirem comigo todo aprendizado e experiência voltados à estética. Eu amo e tenho muito orgulho de cada uma de vocês. Vocês são inspirações!

Agradeço também aos novos amigos, companheiros que a Medicina me deu. Agradeço por dividirem comigo esse sonho e por me apoiarem, mesmo eu fazendo várias coisas ao mesmo tempo. Agradecimento especial à Laís Domingues pela parceria sempre!

Agradecimento mais que especial aos amigos de laboratório ao longo de toda a jornada, não só que dividiram comigo as emoções no doutorado, mas também na Iniciação Científica e no mestrado: Igor Baptista, João Guilherme, Flávia Graça, Andrea Ferian, Wenddy Willie, Marcos Esteca, Patrícia Cajoeiro, Marianne, Fernando Ribeiro e Maria Rita pela amizade, conversas, por toda ajuda experimental e pelas risadas mais gostosas. Agradeço por todos os momentos de aprendizagem, descontração e companhia de todos os dias. Muito obrigada, por fazerem o meu dia mais feliz, mesmo quando parecia impossível!

Aos amigos e companheiros de departamento em especial à Victória Regina, por todos os momentos emocionantes, de descontração e diversão. Obrigada por dividir sua vida comigo.

Ao Departamento de Anatomia, e aos funcionários do ICB III. Agradecimento especial ao seu Airton e à Patrícia da secretaria, por todo profissionalismo e por ajudarem sempre que precisei!

## **AGRADECIMENTOS ÀS ENTIDADES DE FOMENTO**

Agradeço pelo suporte financeiro, às agências de fomento:

- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001;
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2015/04090-0);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 306915/2014-6).



***“Opte por aquilo que faz o seu coração vibrar,  
apesar de todas as consequências.”***

**Osho**

## RESUMO

Jerez, MB. **Efeitos da superexpressão da sequência mimética do mir-101a na regeneração muscular esquelética.** 2022. 79 p. [Tese (Doutorado em Biologia de sistemas)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2022.

O tecido muscular esquelético é altamente especializado e uma das suas principais características é a plasticidade muscular, que abrange os processos de reparo tecidual (regeneração) e de regulação da massa (hipertrofia/atrofia). A regeneração muscular, tem sido apontada como moduladora e/ou modulada pela expressão de microRNAs específicos, de forma que a ablação de alguns destes microRNAs podem perturbar esse processo. Neste sentido, já foi demonstrado o envolvimento do microRNA 101a (miR-101a) no processo de diferenciação de células satélites no músculo esquelético, no entanto, ainda não está bem elucidado o papel do miR-101a durante outros processos plásticos, sendo este o objetivo deste trabalho. Foi investigada a função do miR-101a utilizando o método de superexpressão por eletroporação de sequência mimética (o que resultou no aumento da expressão ~4x acima do basal) no músculo tibial anterior de camundongos, e observamos o envolvimento do miR-101a no processo de regeneração muscular. Inicialmente, a superexpressão do miR-101a provocou um desarranjo na arquitetura tecidual com concomitante aumento de infiltrado inflamatório após 4 dias de eletroporação, indicando que esse microRNA possui funções durante o processo inicial de regeneração (fase inflamatória), uma vez que os animais eletroporados por 7 dias apresentam regeneração normal. Além disso, mostramos que a superexpressão do miR-101a é capaz de reprimir a expressão gênica de MuRF-1 (~92%), MuRF-2 (~65%) e MuRF-3 (~85%), mostrando que esse microRNA atua na regulação de MuRF's. A superexpressão do miR-101a após 3 dias de lesão por Cardiotoxina (CTX) resultou em aumento da área de secção transversal (~2x), aumentando também a quantidade de células satélites (~58%); reduzindo a quantidade de macrófagos (~53%) e a expressão gênica de colágeno tipo I (em até 60%) e III (em até 90%). Esses resultados indicam um possível envolvimento do miR101a durante diferentes fases da regeneração muscular esquelética, regulando a fase inflamatória através da modulação de infiltrados inflamatório e regulando a expressão de genes atroficos,

induzindo a proliferação de células satélites, além de efeitos anti-fibróticos durante a fase miogênica.

**Palavras-chave:** Músculo esquelético. Regeneração. MicroRNA. miR-101a. Fibrose.

## ABSTRACT

Jerez, MB. **Mir-101a mimetic sequence overexpression effects on skeletal muscle regeneration**. 2022. 79 p. [Ph.D. Thesis (Doctor in Sciences)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2022.

Skeletal muscle tissue is highly specialized and one of its main characteristics is muscle plasticity, which encompasses the processes of tissue repair (regeneration) and mass regulation (hypertrophy/atrophy). Muscle regeneration has been identified as modulating and/or modulated by specific microRNAs expression, so the ablation of some of these microRNAs can disrupt this process. Regarding this, the involvement of microRNA 101a (miR-101a) of process satellite cells differentiation in skeletal muscle has already been demonstrated, however, the role of miR-101a during other plastic processes is still unknown, so that is this work goal. The function of miR-101a was investigated using mimetic sequence overexpression by electroporation method (resulting in an expression increase ~4x above baseline) in the mice tibialis anterior muscle, and we observed the miR-101a participation during the process of muscle regeneration. Initially, miR-101a overexpression triggered a disarrangement of the tissue architecture with a concomitant inflammatory infiltrate increase after 4 days of electroporation, showing that miR-101a acts during the initial regeneration process (inflammatory phase), as the electroporated animals for 7 days showed normal regeneration. Furthermore, we saw the miR-101a overexpression can repress MuRF-1 gene expression (~92%), MuRF-2 (~65%) and MuRF-3 (~85%), showing that miR-101a acts in MuRF's regulation. miR-101a overexpression after 3 days of cardiotoxin (CTX) injury resulted an increase in the cross-sectional area (~2x), also increasing the satellite cells (~58%); decreasing macrophages (~53 %) and the collagen type I (up to 60%) and III (up to 90%) gene expressions. These results indicate a possible miR101a involvement during skeletal muscle different regeneration phases, regulating the inflammatory phase through inflammatory infiltrates modulation, regulating the atrophic genes expression, and inducing the satellite cells proliferation, besides anti-fibrotic effects during the myogenic phase.

**Keywords:** Skeletal muscle. Regeneration. MicroRNA. miR-101a. fibrosis.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Akt</b>	Protein kinase B
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animal
<b>CONCEA</b>	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
<b>CSA</b>	Área de secção transversal
<b>CTGF</b>	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
<b>Ctrl</b>	Animais do grupo controle
<b>DAPI</b>	4',6-dianidino-2-fenilidol
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DNA</b>	Ácido deoxiribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>E3 ligases</b>	Enzimas ubiquitina-ligases
<b>EDL</b>	Músculo extensor longo dos dedos (extensor digitorum longus)
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>eIF4E</b>	Eukaryotic translation initiation factor 4E
<b>ETOH</b>	Álcool Etílico
<b>EV</b>	Empty Vector
<b>FGF</b>	Fator de crescimento de fibroblastos
<b>FOXO</b>	Forkhead box O transcription factors
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e eosina
<b>HGF</b>	Hepatocyte growth factor
<b>HSP47</b>	Proteína do choque térmico 47
<b>IGF-1</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina (insulin like growth factor)
<b>IL</b>	Interleucina
<b>ICB</b>	Instituto de Ciências Biomédicas

<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>mTOR</b>	Proteína alvo da rapamicina de mamíferos
<b>miRNA</b>	MicroRNAs
<b>MuRF1</b>	Muscle-specific RING finger-1
<b>MuRF2</b>	Muscle-specific RING finger-2
<b>MuRF3</b>	Muscle-specific RING finger-3
<b>Myf</b>	Fator miogênico (myogenic factor)
<b>MyHC</b>	Miosina de cadeia pesada
<b>MyoD</b>	Myoblast determination protein 1
<b>MyoG</b>	Myogenin (myogenic factor 4)
<b>Pax-7</b>	Paired box protein Pax-7
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinosito-3-quinase
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RNAm</b>	Ácido Ribonucleico mensageiro
<b>RT</b>	Transcrição reversa
<b>S6K1</b>	Proteína quinase S6
<b>TA</b>	Tibial Anterior
<b>TBS</b>	Tris-Buffered Saline
<b>TBS-T</b>	Tris-Buffered Saline with Tween 20
<b>TCF4</b>	Fator de transcrição 4
<b>TGF-β</b>	Fator de transformação do crescimento beta
<b>Thr</b>	Treonina
<b>TNFα</b>	Fator de necrose tumoral-α
<b>U.A.</b>	Unidade arbitrária
<b>UPS</b>	Sistema ubiquitina-proteassomo
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo

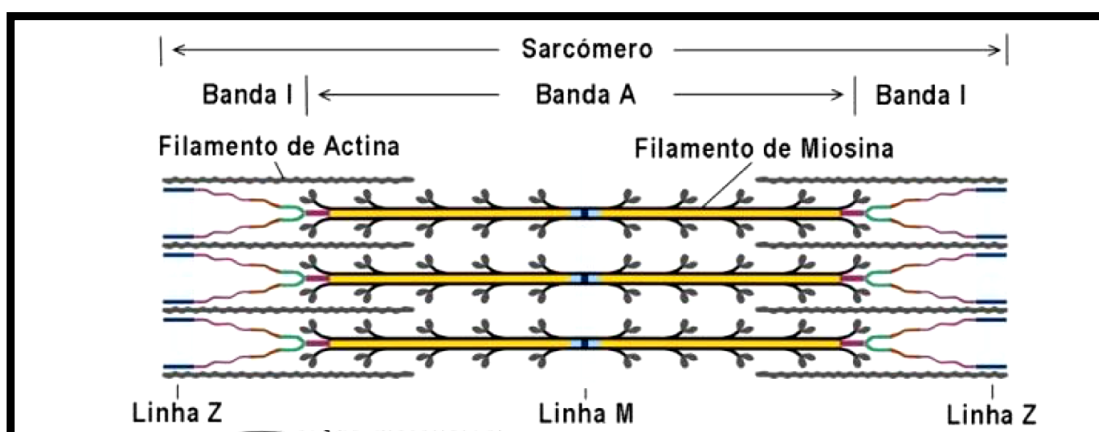
## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O tecido muscular esquelético e seu reparo

O tecido muscular esquelético compreende aproximadamente 40% a 60% de toda a massa corporal humana, por isso é considerado como o tecido mais abundante do corpo humano. Este tecido é constituído por células com formato cilíndrico, que são alongadas, multinucleadas e seu tamanho varia de 10 a 100 micrômetros de diâmetro, podendo chegar a vários centímetros de comprimento. Os núcleos dessas células são dispostos perifericamente, junto à membrana plasmática, a qual recebe o nome de sarcolema, e seu citoplasma é preenchido por filamentos proteicos dispostos longitudinalmente denominados miofibrilas, compostas basicamente por duas proteínas contráteis, Actina e Miosina, que são responsáveis pela constituição dos sarcômeros. Os sarcômeros são as unidades básicas de contração muscular esquelética que podem ser facilmente observados através da microscopia eletrônica, e evidenciam estrias transversais, que são denominadas de bandas claras ou bandas I (isotrópica) e bandas escuras ou bandas A (anisotrópica). No centro de cada banda A é possível observar uma banda um pouco mais clara, conhecida como banda H (proveniente da palavra *Heller* do idioma alemão, que significa “mais brilhante”), esta, por sua vez, é dividida ao meio por uma linha chamada de linha M (do alemão *Mittelscheibe*, que quer dizer “disco central”) A banda I possui uma linha escura centralizada, chamada de linha Z (também proveniente do alemão *Zwischenscheibe*, que quer dizer “disco intermediário”) (BERNE 2004; GANONG 2006). O Sarcômero é a região da miofibrila que se estende de uma linha Z a outra linha Z como podemos ver na Figura 1 (Castro-Ferreira, Fontes-Carvalho et al. 2011).

O deslizamento dos filamentos de Actina e Miosina nos sarcômeros em série, permite que haja contração da fibra muscular, gerando a tensão necessária para a dinâmica de movimento do tecido. Essa capacidade de gerar tensão do músculo estriado esquelético o torna um tecido altamente especializado na produção de força e movimento, estando diretamente relacionado com muitas funções em nosso organismo, tais como fixação e mobilidade do esqueleto, retorno venoso, movimentação do globo ocular, termogênese e respiração. É importante destacar que o tecido muscular esquelético é capaz de se modificar, adicionando ou removendo

unidades contráteis (sarcômeros), induzindo o ganho ou perda de força, que ocorrem nos processos adaptativos de hipertrofia e atrofia, respectivamente. Além disso, já é conhecido seu papel como regulador do metabolismo, por ser um dos principais tecidos responsáveis pelo armazenamento de glicogênio e conseqüentemente, fornecimento de aminoácidos para processos metabólicos (Lieber 2002; Junqueira 2004).



**Figura 1- Esquema ilustrativo representando o sarcômero.**

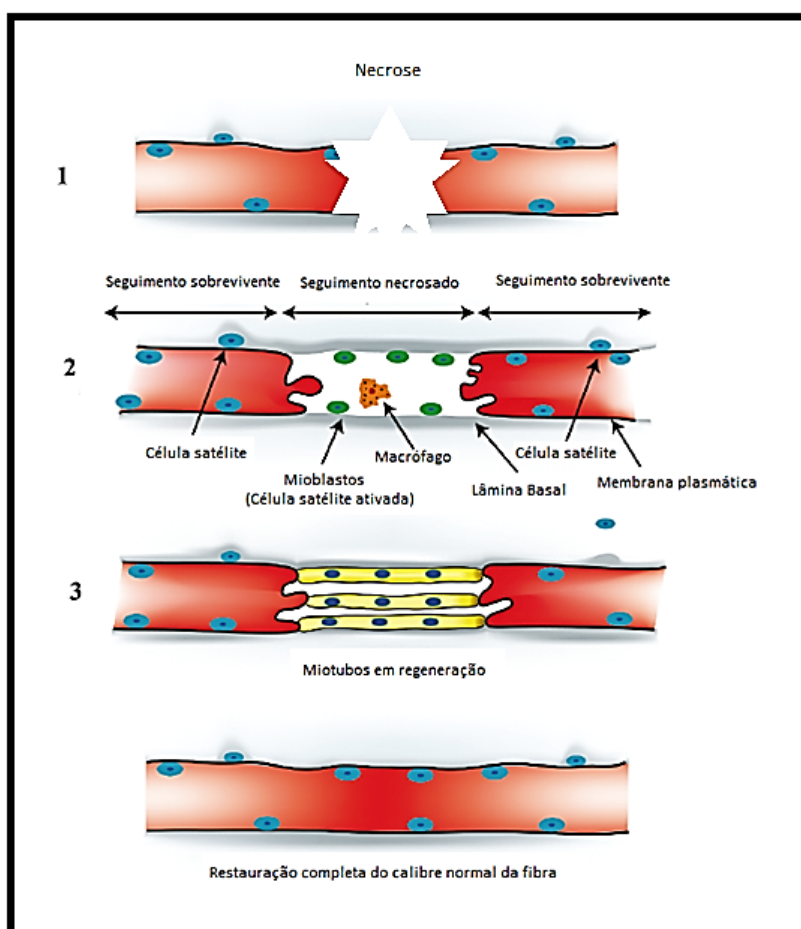
Estão representadas as proteínas miofibrilares, a Actina e a Miosina; as divisões de bandas claras (I) e de bandas escuras (A), além de indicar as linhas M e Z. Adaptado de Castro-Ferreira 2011 (Castro-Ferreira, Fontes-Carvalho et al. 2011).

Durante o desenvolvimento embrionário, as células musculares estriadas esqueléticas são formadas a partir da fusão de mioblastos, que são células precursoras das fibras musculares esqueléticas. Estas células se alinham e fundem-se para formação células multinucleadas, chamadas de miotubos, que serão maturadas somente quando seus núcleos forem direcionados à periferia da célula muscular, deixando o interior preenchido por proteínas contráteis, dando origem à célula muscular esquelética madura (Gartner and Hiatt 1990).

O músculo esquelético possui grande capacidade de adaptar sua massa à demanda mecânica, além de se regenerar. O processo de regeneração do músculo esquelético é originado a partir da lesão (que pode ser de origem química, mecânica ou térmica, bem como por distrofias musculares e miopatias inflamatórias), e pode ser dividido em três fases: degeneração (necrose), inflamação/resposta imune e remodelamento (Figura 2). Na fase de degeneração ocorre lesão do sarcolema, com conseqüente proteólise intensa, seguida de necrose, de forma que é percebida a perda da continuidade das fibras musculares. Posteriormente, segue-se a fase



inflamatória/resposta imune com a presença de células do sistema imunológico, como os Macrófagos, responsáveis pela fagocitose e digestão das miofibras necrosadas e pela secreção de citocinas, capazes de ativar as células satélite. Após esse período, segue-se a fase de remodelamento, quando ocorre a reconstituição do conteúdo proteico. Alguns fatores de crescimento, como FGF (Fibroblast growth factor), HGF (Hepatocyte growth factor) e IGF-1 (Insulin-like growth factor-1), podem promover a síntese proteica, a recuperação da massa muscular e restabelecer a arquitetura tecidual nesta fase de remodelamento (Schiaffino and Partridge 2008).

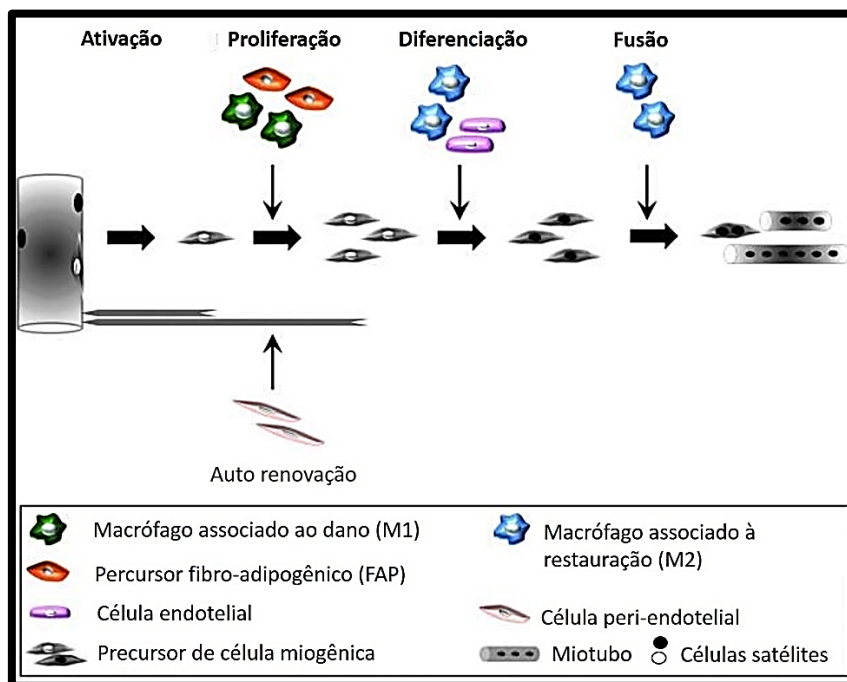


**Figura 2- Esquema ilustrando a regeneração de um segmento de uma fibra necrosada em três etapas:**

1- Fase da degeneração (necrose), onde ocorre a lesão do sarcolema com proteólise intensa. 2- Fase da inflamação/resposta imune, com presença de células do sistema imunológico, como os Macrófagos, responsáveis pela fagocitose e digestão das miofibras necrosadas. Nessa fase também há a secreção de citocinas, capazes de ativar as células satélites. 3- Fase de remodelamento, responsável pela reconstituição do conteúdo proteico, até a restauração completa do calibre da fibra. Adaptado de Schiaffino, 2008 (Schiaffino 2008).

O processo de regeneração é quase inteiramente dependente de uma pequena população de células precursoras da miogênese, chamadas de células satélite, localizadas entre a lâmina basal e as fibras musculares (Figura 3). As células satélites são células multipotentes que permanecem quiescentes, ou seja, inativas até que sejam ativadas. Quando há um estímulo lesivo ao músculo, as células satélites são ativadas e se proliferam, desencadeando um importante processo inflamatório, que recruta progenitores fibro-adipogênicos (FAPs) e macrófagos inflamatórios, conhecidos como M1 (associados ao dano). Em seguida uma fração das células miogênicas se diferencia em mioblastos, concomitantemente ao momento em que a reação inflamatória é regulada pela ativação dos macrófagos anti-inflamatórios, conhecidos como M2 (associados à restauração). A partir da diferenciação em mioblastos, ocorre a fusão destes, formando fibras rudimentares conhecidas como miotubos, que também podem se fundir às fibras musculares pré-existentes, contribuindo com novos núcleos (Joe, Yi et al. 2010; Tedesco, Dellavalle et al. 2010). Parte das células satélites retornam à quiescência através da ação de células Periendothelias, como células musculares lisas, para manter a estabilidade de vasos/capilares (Christov, Chretien et al. 2007; Latroche, Gitiaux et al. 2015).

Em estado de repouso e durante a fase proliferativa, as células satélites expressam a proteína Pax7, que é um fator de transcrição considerado um marcador de células satélites. A atividade destas células miogênicas é, em sua maior parte, regulada por proteínas denominadas de MRFs (Myogenic Regulators Factors), que compreendem Myf5, MRF4, MyoD e MyoG, e que são fundamentais para o processo de diferenciação. Durante a fase de proliferação, as células satélites aumentam a expressão de MyoD (proteína de determinação miogênica) e após a fase de proliferativa, as células satélites saem do ciclo celular e regulam negativamente a expressão de Pax7 e MyoD enquanto aumentam a expressão de MyoG, fator de transcrição específico do tecido muscular (Schiaffino 2008; Chal and Pourquie 2017).



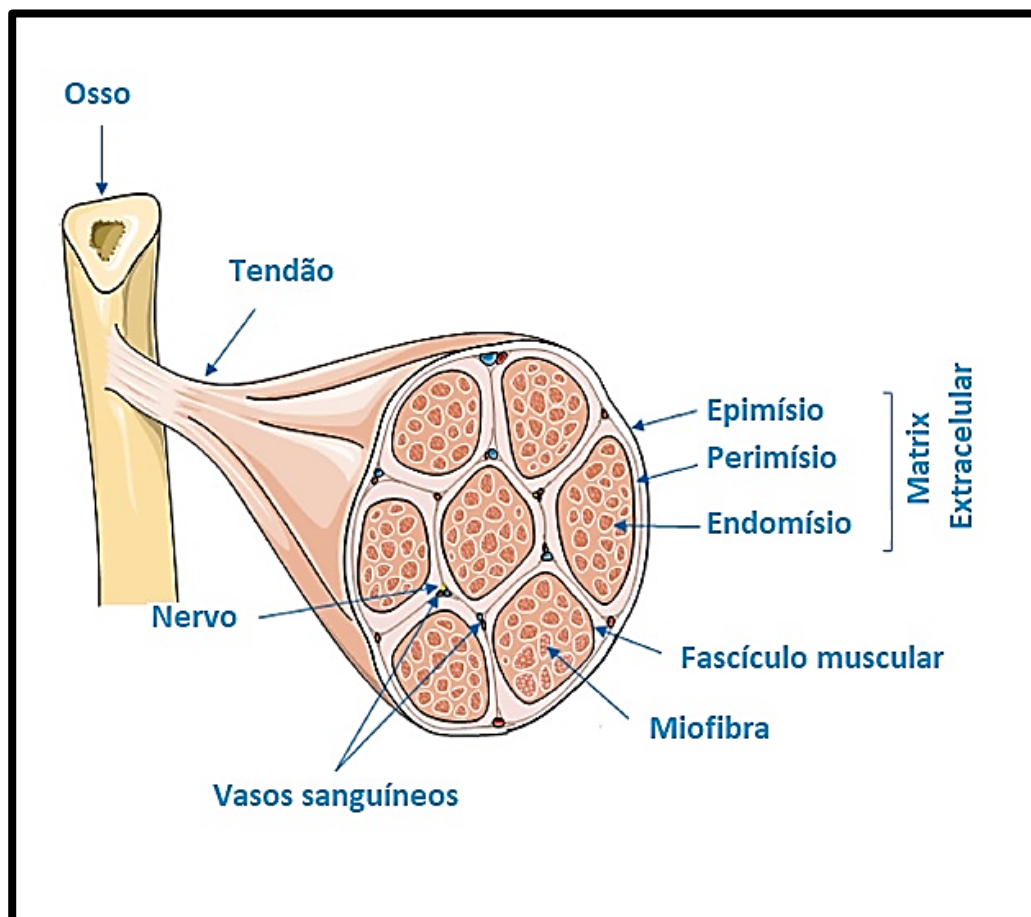
**Figura 3- Esquema ilustrando a miogênese adulta durante a regeneração do músculo esquelético.**

As células satélites são ativadas a se proliferam, onde a reação inflamatória se inicia e acontece o recrutamento de células FAPs e macrófagos inflamatórios (associados ao dano). Em seguida há a diferenciação das células satélites em mioblastos, momento em que a reação inflamatória é cessada através da ativação dos macrófagos anti-inflamatórios (associados à restauração). A partir dessa diferenciação, ocorre a fusão dos mioblastos em miotubos para a formação e/ou reparo de uma nova fibra. Parte das células satélites retornam à quiescência através da ação de células Peri-endoteliais, como células musculares lisas e Pericitos, para manter a estabilidade de vasos/capilares. Adaptado de Le Moal, 2017 (Le Moal, Pialoux et al. 2017).

### **1.2 Matriz extracelular e fibrose do músculo esquelético**

A Matriz extra celular (MEC) muscular é formada por um conjunto de macromoléculas que fornecem auxílio estrutural e bioquímico para as células circundantes (Jarvelainen, Sainio et al. 2009). Composta por três componentes principais: proteína, glicosaminoglicanos e glicoconjugados, essas estruturas unidas formam uma rede dinâmica que sofre remodelação contínua. Sua estrutura possui duas camadas principais: a lâmina basal e a matriz intersticial. A lâmina basal está em contato direto com o sarcolema e é composta principalmente por proteoglicanos do colágeno tipo IV e laminina. A matriz intersticial envolve a lâmina basal e é composta principalmente de colágeno I, III e V e fibronectina (Cornelison 2008). Além da MEC fornecer suporte mecânico, organização e orientação direcional para nervos, vasos e células musculares, ela também é essencial para a organização muscular, formando

o endomísio (tecido conectivo que envolve cada miofibrila individualmente), o perimísio (que envolve grupos de miofibrilas formando os fascículos) e o epimísio (que envolve o conjunto de fascículos) (Mahdy 2019), conforme mostra a Figura 4.



**Figura 4- Esquema ilustrando o arranjo da Matriz extracelular (MEC) no músculo esquelético em seus três níveis:**

Endomísio envolvendo cada miofibrila individual, o Perimísio que envolve grupos de miofibrilas para formar fascículos e o Epimísio que recobre cada músculo. Adaptado de Mahdy, 2019 (Mahdy 2019).

O restabelecimento da MEC frente a um estímulo lesivo é um evento essencial para a regeneração muscular. Alterações dessa matriz como resultado de lesão, principalmente na quantidade ou na composição de colágeno, são refletidas como alterações na rigidez muscular, ou seja, a fibrose muscular (Lieber and Ward 2013). Os prejuízos na modulação da composição da MEC nos músculos lesionados promovem importantes manifestações clínicas, como comprometimento da força e da contratilidade muscular, aumento da infiltração de células inflamatórias e até mesmo a ruptura da lâmina basal (Gillies and Lieber 2011).

A fibrose é caracterizada pela formação deletéria ou anormal de tecido cicatricial durante a regeneração muscular. Diversas moléculas têm sido relatadas por exercerem papel crucial no aumento da fibrose, seja diretamente ou indiretamente, modulando vias relacionadas à deposição de fibrose intersticial, como TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor beta 1), CTGF (connective tissue growth factor) e microRNAs (Li, Foster et al. 2004; Lipson, Wong et al. 2012; Cheng, Dang et al. 2017; Stilhano, Samoto et al. 2017; Kinashi, Ito et al. 2018; Ramazani, Knops et al. 2018; Zhou, Shiok et al. 2018). O TGF- $\beta$ 1 é uma citocina multifuncional, que estimula os fibroblastos a produzirem proteínas da MEC (Delaney, Kasprzycka et al. 2017; Kim and Lee 2017). Sendo descrito como um importante fator pró-fibrótico, devido à sua capacidade de fosforilação de Smad2/3 (Lieber and Ward 2013), que ativa Smad4 e forma um complexo proteico responsável por ativar fatores de transcrição de genes-alvo, como a fibronectina e CTGF (Cisternas, Vio et al. 2014).

### ***1.3 microRNAs durante a regulação da musculatura esquelética***

Os microRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs não codificadores de proteínas, que possuem aproximadamente 22 nucleotídeos e estão envolvidos em vários processos da biologia celular do tecido muscular (Chen, Callis et al. 2009; Guller and Russell 2010). Dentre suas funções, pode-se destacar a repressão da expressão de genes alvo à nível pós-transcricional, através da complementaridade de bases na região 3'UTR (Untranslated Region) de mRNAs alvo, em plantas e animais (Zhao and Srivastava 2007) e são transcritos nas regiões conhecidas como íntrons ou regiões intergênicas (Berezikov, Chung et al. 2007).

A biogênese do microRNA é iniciada quando um longo transcrito primário é produzido no núcleo celular pela RNA Polimerase II, chamado de pri-miRNA. Esse transcrito possui uma estrutura em formato de grampo com 7-metilguanossina na sua porção 5' e é poliadenilado na sua porção 3'. O processamento desse pri-miRNA pode ocorrer simultaneamente à transcrição. Este pequeno transcrito logo é processado por uma enzima nuclear, Ribonuclease III denominada Drosha, formando assim, os pré-miRNAs, podendo ocorrer simultaneamente à transcrição. Para que haja a maturação desses pré-miRNAs, é necessário seu transporte para o citoplasma através das Exportin-5 e Ran-GTP (Lund, Guttinger et al. 2004; Pereira 2015). No citoplasma, a RNase DICER os cliva em fragmentos de aproximadamente 22-23 nucleotídeos de

miRNA dupla fita. Essa dupla fita de RNA é então separada por uma helicase, sendo que uma das fitas é complexada pela RISC (RNA-induced silencing complex), uma ribonucleoproteína. Por fim, o complexo RNA-RISC se liga ao mRNA alvo, induzindo sua degradação ou impedindo sua tradução (Bartel 2004; Zhao and Srivastava 2007).

Ainda não está descrito claramente o papel do conjunto de miRNAs envolvidos na regulação muscular esquelética, porém, existem alguns miRNAs que são apresentados como específicos do músculo esqueléticos, chamados de MyomiRs (Siracusa, Koulmann et al. 2018). A literatura já demonstrou que o aumento da expressão do miR-1 foi capaz de induzir a atrofia muscular, através da regulação indireta dos atrogenes (Kukreti, Amuthavalli et al. 2013), além de diminuir a expressão de IGF-1 e IGF1-R, reduzindo então a massa muscular cardíaca em um modelo de acromegalia (Elia L 2009). Alguns miRNAs descritos como reguladores positivos da massa muscular esquelética são o miR-133a, que está associado à hipertrofia muscular esquelética (McCarthy and Esser 2007) e o miR-128a, pela demonstração de que seu antagonista induziu a hipertrofia muscular em camundongos, já que esse miRNA têm como alvo IRS1 (Motohashi, Alexander et al. 2013). Quanto aos microRNAs capazes de proteger o trofismo celular em processos de atrofia muscular esquelética, já foi descrito que o miR-23a pode regular a expressão de atrogin-1 e MuRF1 (Wada S 2008; Wada S 2011; Hudson MB 2014) e o miR-27, que tem como alvo a miostatina, esta por sua vez, é um importante regulador da massa muscular (Huang, Chen et al. 2012). Ainda assim, estes miRNAs já descritos não são capazes de contemplar toda a complexidade da plasticidade muscular.

O processo plástico da regeneração muscular tem sido mostrado como regulador e/ou regulado por certos microRNAs já que alguns microRNAs são regulados durante o processo regenerativo e a ablação de outros podem perturbar a resolução desse processo (Goljanek-Whysall, Sweetman et al. 2012). Entretanto, a rede de microRNAs envolvida no controle da plasticidade muscular esquelética é provavelmente maior do que os microRNAs descritos. O miR-101a já foi descrito como envolvido no processo de diferenciação de células satélites no músculo esquelético de cabras (Li, Zhao et al. 2017), além de evidenciado na regeneração do miocárdio (Xiao, He et al. 2017).

Recentemente foram descritos os principais microRNAs negativamente modulados durante a regeneração muscular e dentre os resultados o miR-101a se destaca (Chen, Melton et al. 2012). Nesse estudo, Chen e colaboradores mostram

que durante a regeneração, após lesão com Cardiotoxina, os níveis do miR-101a alcançam um pico de repressão em 4 dias após lesão muscular induzida por inoculação de Cardiotoxina (VALUE -13.58), e essa repressão é atenuada após 7 dias lesão (VALUE -9.30) sendo praticamente abolida após 21 dias (VALUE -3.38). Esses resultados sugeriram que o mir-101a desenvolve um papel importante durante fase aguda da regeneração muscular (Chen, Melton et al. 2012). Estes dados estão armazenados no banco de dados GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>, serie number: GSE37479). Estudos *in silico* (Target Scan) desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, evidenciaram esse microRNA por ter como alvo predito MuRF-1, uma importante E3 ligase envolvida na resposta regenerativa do músculo esquelético e na miogênese (Moriscot A.S 2019). Apesar disto, ainda não está claro o papel do miR-101a no músculo esquelético.

Tendo em vista todas essas eminentes evidências de uma importante participação do miR-101a nos processos plásticos musculares, o presente trabalho teve como objetivo determinar os efeitos da superexpressão da sequência mimética do miR-101a na regulação da massa muscular esquelética e ao final, este demonstrou-se desempenhar funções importantes durante o processo de regeneração muscular esquelética.

## 6 CONCLUSÕES

Podemos concluir que ao usar um modelo de superexpressão do miR-101a, a arquitetura tecidual do músculo esquelético é modificada em uma fase aguda (transitória) e que esse evento é marcado por um forte aumento de células inflamatórias. Podemos articular também que, a superexpressão do miR-101a pode induzir um efeito anti-fibrótico no músculo esquelético em processo de regeneração pós-lesão, com aumento de células satélites, diminuição de macrófagos e redução da expressão gênica de colágeno tipo I e III, além da redução da marcação de fibras colágenas.

De modo geral, os resultados obtidos contribuem com conhecimento sobre a função do miR-101a durante a regeneração muscular esquelética e, tendo em vista que o efeito da superexpressão desse miR no músculo esquelético sobre a deposição de fibrose intersticial ainda é pouco estudado neste tecido, se fazem necessários novos estudos utilizando modelos de indução de fibrose, associados à modulação de expressão do miR-101a para melhor elucidar seu papel nesses mecanismos.



## REFERÊNCIAS\*

Arnold, L., A. Henry, et al. (2007). "Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis." J Exp Med **204**(5): 1057-1069.

Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-297.

Beauchemin, M., A. Smith, et al. (2015). "Dynamic microRNA-101a and Fosab expression controls zebrafish heart regeneration." Development **142**(23): 4026-4037.

Berezikov, E., W. J. Chung, et al. (2007). "Mammalian mirtron genes." Mol Cell **28**(2): 328-336.

BERNE, R. M., LEVY, M.N., KOEPPEN, B.M. & STANTON, B.A. (2004). Fisiologia. Rio de Janeiro, Ed. Elsevier.

Border, W. A. and N. A. Noble (1994). "Transforming growth factor beta in tissue fibrosis." N Engl J Med **331**(19): 1286-1292.

Brennecke, J., A. Stark, et al. (2005). "Principles of microRNA-target recognition." PLoS Biol **3**(3): e85.

Castro-Ferreira, R., R. Fontes-Carvalho, et al. (2011). "The role of titin in the modulation of cardiac function and its pathophysiological implications." Arq Bras Cardiol **96**(4): 332-339.

Chal, J. and O. Pourquie (2017). "Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro." Development **144**(12): 2104-2122.

---

\*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Chen, E. Y., C. M. Tan, et al. (2013). "Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool." BMC Bioinformatics **14**: 128.

Chen, J. F., T. E. Callis, et al. (2009). "microRNAs and muscle disorders." J Cell Sci **122**(Pt 1): 13-20.

Chen, Y., D. W. Melton, et al. (2012). "MiR-351 transiently increases during muscle regeneration and promotes progenitor cell proliferation and survival upon differentiation." Physiol Genomics **44**(21): 1042-1051.

Cheng, R., R. Dang, et al. (2017). "MicroRNA-98 inhibits TGF-beta1-induced differentiation and collagen production of cardiac fibroblasts by targeting TGFBR1." Hum Cell **30**(3): 192-200.

Christov, C., F. Chretien, et al. (2007). "Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners." Mol Biol Cell **18**(4): 1397-1409.

Cisternas, P., C. P. Vio, et al. (2014). "Role of Wnt signaling in tissue fibrosis, lessons from skeletal muscle and kidney." Curr Mol Med **14**(4): 510-522.

Cornelison, D. D. (2008). "Context matters: in vivo and in vitro influences on muscle satellite cell activity." J Cell Biochem **105**(3): 663-669.

Cui, S., L. Li, et al. (2019). "Wnt/beta-catenin signaling induces the myomiRs miR-133b and miR-206 to suppress Pax7 and induce the myogenic differentiation program." J Cell Biochem **120**(8): 12740-12751.

de Winter, P., P. Leoni, et al. (2008). "Connective tissue growth factor: structure-function relationships of a mosaic, multifunctional protein." Growth Factors **26**(2): 80-91.

Delaney, K., P. Kasprzycka, et al. (2017). "The role of TGF-beta1 during skeletal muscle regeneration." Cell Biol Int **41**(7): 706-715.

Ding, H., Y. Xu, et al. (2020). "Upregulation of miR-101a Suppresses Chronic Renal Fibrosis by Regulating KDM3A via Blockade of the YAP-TGF-beta-Smad Signaling Pathway." Mol Ther Nucleic Acids **19**: 1276-1289.

Ding, H., Y. Zhou, et al. (2019). "MiR-101a ameliorates AngII-mediated hypertensive nephropathy by blockade of TGFbeta/Smad3 and NF-kappaB signalling in a mouse model of hypertension." Clin Exp Pharmacol Physiol **46**(3): 246-254.

Dona, M., M. Sandri, et al. (2003). "Functional in vivo gene transfer into the myofibers of adult skeletal muscle." Biochem Biophys Res Commun **312**(4): 1132-1138.

Du, H., C. H. Shih, et al. (2017). "Macrophage-released ADAMTS1 promotes muscle stem cell activation." Nat Commun **8**(1): 669.

Elia L, C. R., Quintavalle M, Varrone F, Chimenti C, Russo MA, Cimino V, De Marinis L, Frustaci A, Catalucci D, Condorelli G. (2009). "Reciprocal regulation of microRNA-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions." Circulation **120**(2377): 85.

Engquist, E. N. and P. S. Zammit (2021). "The Satellite Cell at 60: The Foundation Years." J Neuromuscul Dis **8**(s2): S183-S203.

GANONG, W. F. (2006). Fisiologia Medica. Porto Alegre, RS.

Gartner, L. P. and J. L. Hiatt (1990). Color atlas of histology. Baltimore, Williams & Wilkins.

Ge, G., D. Yang, et al. (2019). "miR-10b-5p Regulates C2C12 Myoblasts Proliferation and Differentiation." Biosci Biotechnol Biochem **83**(2): 291-299.

Gillies, A. R. and R. L. Lieber (2011). "Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix." Muscle Nerve **44**(3): 318-331.

Goljanek-Whysall, K., D. Sweetman, et al. (2012). "microRNAs in skeletal muscle differentiation and disease." Clin Sci (Lond) **123**(11): 611-625.

Guller, I. and A. P. Russell (2010). "MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function." J Physiol **588**(Pt 21): 4075-4087.

Holbourn, K. P., K. R. Acharya, et al. (2008). "The CCN family of proteins: structure-function relationships." Trends Biochem Sci **33**(10): 461-473.

Huang, Z., X. Chen, et al. (2012). "MicroRNA-27a promotes myoblast proliferation by targeting myostatin." Biochem Biophys Res Commun **423**(2): 265-269.

Hudson MB, W.-H. M., Zheng B, Rahnert JA, Blount MA, Gooch JL, Searles CD, Price SR. (2014). "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.

Jarvelainen, H., A. Sainio, et al. (2009). "Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy." Pharmacol Rev **61**(2): 198-223.

Joe, A. W., L. Yi, et al. (2010). "Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis." Nat Cell Biol **12**(2): 153-163.

Junqueira, L. C. C., J. (2004). Histologia Básica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A.

Kim, J. and J. Lee (2017). "Role of transforming growth factor-beta in muscle damage and regeneration: focused on eccentric muscle contraction." J Exerc Rehabil **13**(6): 621-626.

Kinashi, H., Y. Ito, et al. (2018). "Roles of the TGF-beta(-)VEGF-C Pathway in Fibrosis-Related Lymphangiogenesis." Int J Mol Sci **19**(9).

Kukreti, H., K. Amuthavalli, et al. (2013). "Muscle-specific microRNA1 (miR1) targets heat shock protein 70 (HSP70) during dexamethasone-mediated atrophy." J Biol Chem **288**(9): 6663-6678.

Kuleshov, M. V., M. R. Jones, et al. (2016). "Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update." Nucleic Acids Res **44**(W1): W90-97.

Latroche, C., C. Gitiaux, et al. (2015). "Skeletal Muscle Microvasculature: A Highly Dynamic Lifeline." Physiology (Bethesda) **30**(6): 417-427.

Le Moal, E., V. Pialoux, et al. (2017). "Redox Control of Skeletal Muscle Regeneration." Antioxid Redox Signal **27**(5): 276-310.

Lewis, B. P., I. H. Shih, et al. (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." Cell **115**(7): 787-798.

Li, C., M. M. Xu, et al. (2018). "Macrophage polarization and meta-inflammation." Transl Res **191**: 29-44.

Li, D., S. Zhan, et al. (2015). "Role of microRNA-101a in the regulation of goat skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation." Gene **572**(2): 198-204.

Li, J. T., W. Zhao, et al. (2017). "miR-101a targeting EZH2 promotes the differentiation of goat skeletal muscle satellite cells." Yi Chuan **39**(9): 828-836.

Li, Y., W. Foster, et al. (2004). "Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis." Am J Pathol **164**(3): 1007-1019.

Lieber, R. L. (2002). Skeletal Muscle - Structure, Function and Plasticity. Baltimore, Lippincott Williams&Wilkins.

Lieber, R. L. and S. R. Ward (2013). "Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 4. Structural and functional consequences of skeletal muscle fibrosis." Am J Physiol Cell Physiol **305**(3): C241-252.

Lipson, K. E., C. Wong, et al. (2012). "CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis." Fibrogenesis Tissue Repair **5**(Suppl 1): S24.

Lund, E., S. Guttinger, et al. (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." Science **303**(5654): 95-98.

Mahdy, M. A. A. (2019). "Skeletal muscle fibrosis: an overview." Cell Tissue Res **375**(3): 575-588.

McCarthy, J. J. and K. A. Esser (2007). "MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy." J Appl Physiol (1985) **102**(1): 306-313.

Meng, X. M., D. J. Nikolic-Paterson, et al. (2016). "TGF-beta: the master regulator of fibrosis." Nat Rev Nephrol **12**(6): 325-338.

Miklavcic, D. (2017). Handbook of Electroporation.

Molnar, M. J., R. Gilbert, et al. (2004). "Factors influencing the efficacy, longevity, and safety of electroporation-assisted plasmid-based gene transfer into mouse muscles." Mol Ther **10**(3): 447-455.

Moriscot A.S, B. I. L., Silva W.S., Silvestre J.G., Adams V. , Gasch A. , Bogomolovas J. , Labeit S. . (2019). "MuRF1 and MuRF2 are key players in skeletal muscle regeneration involving myogenic deficit and deregulation of the chromatin-remodeling complex." Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle Rapid Communications **2**(1): 25.

Moriscot, A. S., I. L. Baptista, et al. (2010). "MuRF1 is a muscle fiber-type II associated factor and together with MuRF2 regulates type-II fiber trophicity and maintenance." J Struct Biol **170**(2): 344-353.

Motohashi, N., M. S. Alexander, et al. (2013). "Regulation of IRS1/Akt insulin signaling by microRNA-128a during myogenesis." J Cell Sci **126**(Pt 12): 2678-2691.

Pan, Z., X. Sun, et al. (2012). "MicroRNA-101 inhibited postinfarct cardiac fibrosis and improved left ventricular compliance via the FBJ osteosarcoma oncogene/transforming growth factor-beta1 pathway." Circulation **126**(7): 840-850.

Pereira, T. C. (2015). Introdução ao mundo dos microRNAs. Ribeirão preto, Editora Cubo.

Ramanujam, D., A. P. Schon, et al. (2021). "MicroRNA-21-Dependent Macrophage-to-Fibroblast Signaling Determines the Cardiac Response to Pressure Overload." Circulation **143**(15): 1513-1525.

Ramazani, Y., N. Knops, et al. (2018). "Connective tissue growth factor (CTGF) from basics to clinics." Matrix Biol **68-69**: 44-66.

Razak, A. M., S. C. Khor, et al. (2018). "Targeting myomiRs by tocotrienol-rich fraction to promote myoblast differentiation." Genes Nutr **13**: 31.

Relaix, F., M. Bencze, et al. (2021). "Perspectives on skeletal muscle stem cells." Nat Commun **12**(1): 692.

Roda, A., P. Pasini, et al. (2004). "Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence." Trends Biotechnol **22**(6): 295-303.

Saika, R., H. Sakuma, et al. (2017). "MicroRNA-101a regulates microglial morphology and inflammation." J Neuroinflammation **14**(1): 109.

Schiaffino, S. and T. Partridge (2008). Advances in muscle research. Amsterdam, Springer.

Schiaffino, S. a. T. P., Ed. (2008). Skeletal muscle repair and regeneration. Amsterdam, Springer 380.

Shang, M., F. Cappellesso, et al. (2020). "Macrophage-derived glutamine boosts satellite cells and muscle regeneration." Nature **587**(7835): 626-631.

Siracusa, J., N. Koulmann, et al. (2018). "Circulating myomiRs: a new class of biomarkers to monitor skeletal muscle in physiology and medicine." J Cachexia Sarcopenia Muscle **9**(1): 20-27.

Stilhano, R. S., V. Y. Samoto, et al. (2017). "Reduction in skeletal muscle fibrosis of spontaneously hypertensive rats after laceration by microRNA targeting angiotensin II receptor." PLoS One **12**(10): e0186719.

Tan, Y., L. Shen, et al. (2020). "Downregulated miR-204 Promotes Skeletal Muscle Regeneration." Biomed Res Int **2020**: 3183296.

Tedesco, F. S., A. Dellavalle, et al. (2010). "Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells." J Clin Invest **120**(1): 11-19.

Varga, T., R. Mounier, et al. (2016). "Macrophage PPARgamma, a Lipid Activated Transcription Factor Controls the Growth Factor GDF3 and Skeletal Muscle Regeneration." Immunity **45**(5): 1038-1051.

Wada S, K. Y., Okutsu M, Miyaki S, Suzuki K, Yan Z, Asahara H, Ushida T, Akimoto T. (2008). "Stress responsive miR-23a attenuates skeletal muscle atrophy by targeting MAFbx /atrogen-1." Nature proceedings **2175**(1).

Wada S, K. Y., Okutsu M, Miyaki S, Suzuki K, Yan Z, Schiaffino S, Asahara H, Ushida T, Akimoto T, (2011). "Translational suppression of atrophic regulators by microRNA-23a integrates resistance to skeletal muscle atrophy." J Biol Chem **286**(38456): 65.



Wang, J., C. J. Lee, et al. (2020). "MiR-101a loaded extracellular Nanovesicles as bioactive carriers for cardiac repair." Nanomedicine: 102201.

Wu, J., D. He, et al. (2017). "miR-101-1 expression pattern in Qinchuan cattle and its role in the regulation of cell differentiation." Gene **636**: 64-69.

Wu, Y., Z. Fan, et al. (2020). "Astragaloside IV protects human cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury by regulating miR-101a." Mol Cell Biochem **470**(1-2): 41-51.

Xiao, L., H. He, et al. (2017). "Effects of miR-29a and miR-101a Expression on Myocardial Interstitial Collagen Generation After Aerobic Exercise in Myocardial-infarcted Rats." Arch Med Res **48**(1): 27-34.

Zhang, L., R. Liu, et al. (2018). "Tumor Necrosis Factor-alpha Induced Protein 8: Pathophysiology, Clinical Significance, and Regulatory Mechanism." Int J Biol Sci **14**(4): 398-405.

Zhao, Y. and D. Srivastava (2007). "A developmental view of microRNA function." Trends Biochem Sci **32**(4): 189-197.

Zheng, Y., Z. Wang, et al. (2015). "miR-101a and miR-30b contribute to inflammatory cytokine-mediated beta-cell dysfunction." Lab Invest **95**(12): 1387-1397.

Zhou, Y., T. C. Shiok, et al. (2018). "MicroRNA-101a suppresses fibrotic programming in isolated cardiac fibroblasts and in vivo fibrosis following trans-aortic constriction." J Mol Cell Cardiol **121**: 266-276.