

GETÚLIO PEREIRA DE OLIVEIRA JÚNIOR

ANÁLISE DE MICRORNAS MÚSCULO ESPECÍFICOS EM FRAÇÕES PLASMÁTICAS
ANTES E APÓS CORRIDA DE MEIA MARATONA

Brasília, 2012

GETÚLIO PEREIRA DE OLIVEIRA JÚNIOR

**ANÁLISE DE MICRORNAS MÚSCULO ESPECÍFICOS EM
FRAÇÕES PLASMÁTICAS ANTES E APÓS CORRIDA DE MEIA
MARATONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção de Título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientador: Rinaldo Wellerson Pereira

Brasília

2012

Dissertação de autoria de Getúlio Pereira de Oliveira Júnior intitulado “ANÁLISE DE MICRORNAS MÚSCULO ESPECÍFICOS EM FRAÇÕES PLASMÁTICAS ANTES E APÓS CORRIDA DE MEIA MARATONA”, apresentado como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, em 7 de Agosto de 2012, defendido e aprovado pela banca examinadora abaixo assinada:

Dr. Rinaldo Wellerson Pereira

Universidade Católica de Brasília – UCB, programa de pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia.
Orientador

Dr. Fabio Pittella Silva

Universidade de Brasília – UnB, programa de pós-graduação em Patologia Molecular.
Examinador

Dr. Robert Pogue

Universidade Católica de Brasília – UCB, programa de pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia.
Examinador

Brasília

2012

“É bom quando nossa consciência sofre grandes ferimentos, pois isso a torna mais sensível a cada estímulo. Penso que devemos ler apenas livros que nos ferem, que nos afligem. Se o livro que estamos lendo não nos desperta como um soco no crânio, por que perder tempo lendo-o? Para que ele nos torne felizes, como você diz? Oh Deus, nós seríamos felizes do mesmo modo se esses livros não existissem. Livros que nos fazem felizes poderíamos escrever nós mesmos num piscar de olhos. Precisamos de livros que nos atinjam como a mais dolorosa desventura, que nos assolem profundamente – como a morte de alguém que amávamos mais do que a nós mesmos –, que nos façam sentir que fomos banidos para o ermo, para longe de qualquer presença humana – como um suicídio. Um livro deve ser um machado para o mar congelado que há dentro de nós”

Franz Kafka

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Rinaldo Wellerson Pereira, pela oportunidade, confiança, orientação e pela dedicação em corrigir este trabalho;

Aos ex-orientadores e professores que durante a graduação me introduziram no mundo da pesquisa científica: Dra. Luciana Galvão, Dr. Guy de Capdeville, Dra. Lucília Marcelino e Dra. Joseilde Werneck;

A todo o grupo de genética molecular humana do laboratório de ciências genômicas e biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, por compartilhar momentos de felicidade e frustração, aos (às) doutorandos (as) Túlio, Marcela, Tati, Jéssica, à mestranda Tainá e às alunas de iniciação científica Priscilla, Lydyane, Iara, Ana;

À doutoranda Clarissa por toda a paciência no desenho de novos experimentos, na discussão de artigos científicos e principalmente pelo apoio durante as reações de PCR quantitativa;

À minha namorada, Eliane Freitas, por ter me apoiado, compreendido, suportado em todos os momentos e principalmente pela paciência durante a escrita da dissertação;

Aos meus pais, Getúlio e Eloiza, por acreditarem em mim, me apoiarem nas minhas escolhas, pelo carinho, amor e confiança na conclusão deste trabalho;

Ao meu irmão Felipe, pela amizade, pelo exemplo de dedicação e responsabilidade;

Aos meus amigos de infância e adolescência Samamba, Macarrão, Digão e Caio que apesar de nunca terem pegado numa pipeta foram importantes na realização deste trabalho, pois me fizeram lembrar da existência de vida social e me ajudaram a manter a mente saudável durante esses anos;

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado durante a realização deste trabalho;

Aos demais amigos da Embrapa Cenargen, UnB e UCB, inclusive os que agora estão em outros locais, pois todos tiveram importância para que este projeto fosse realizado;

A quaisquer outros que embora não citados, tenham participado desta caminhada;

O mais sincero sentimento de gratidão.

RESUMO

O papel do exercício físico de endurance é bem estabelecido na promoção da saúde e proteção contra doenças, principalmente aquelas associadas ao sistema cardiovascular. No entanto, são pouco conhecidos os mecanismos moleculares relacionados a esta importante atividade física para a saúde humana. Os miRNAs apareceram na literatura científica nos últimos 19 anos e hoje são caracterizados com importantes efetores no controle da expressão gênica em nível pós-transcricional. Mais recentemente, a partir de 2008, os miRNAs foram identificados no soro ou plasma e diferentes padrões tem sido relacionados com estados patológicos diversos sendo estudados como biomarcadores promissores. Estes miRNAs circulantes têm o potencial de serem transferidos horizontalmente de um tecido para outro, levando mensagens ainda não bem compreendidas pela comunidade científica. Neste projeto, foi analisado o nível de 5 miRNAs (miR-16, -let-7a, -1, -133a, -206) circulantes em duas frações plasmáticas (sobrenadante e vesicular) de 10 atletas recreacionais após a corrida de meia maratona (21 km), assim como foi analisada a estabilidade desses miRNAs após o tratamento com proteinase K. Os resultados mostraram diminuição dos miRNAs miR-16, miR-1, miR-133a, leve aumento no miR-let7a e um grande aumento no miR-206 na fração vesicular após a corrida. O tratamento com proteinase K levou a forte redução nos níveis plasmáticos de miR-16 e miR-133a na fração sobrenadante do plasma indicando que estes miRNAs podem estar circulando no plasma associados à complexos proteicos. Já os miR-let7a, miR-1 e miR-206 não apresentaram forte redução nos níveis plasmáticos nas frações sobrenadante e vesicular do plasma após o tratamento com Proteinase K indicando que estes miRNAs circulam no plasma associados à vesículas lipídicas. Os resultados encontrados sugerem que os níveis plasmáticos de miR-206 associado a fração vesicular aumentam fortemente como resposta ao exercício físico de endurance, sendo o miRNA músculo específico estudado que apresentou maior resposta após o estímulo do exercício. Seria importante compreender os genes alvos regulados pelo miR-206 e também os tecidos alvos das microvesículas transportadoras de miR-206 e assim buscar entender os possíveis mecanismos deste miRNA na adaptação ao exercício físico de endurance, assim como sua participação nos benefícios causados pela atividade física.

Palavras Chave: microRNA, exercício físico, PCR quantitativa

ABSTRACT

The role of endurance exercise is well established in health promotion and protection against diseases, especially those associated with the cardiovascular system. However, little is known about the molecular mechanisms related to how physical activity is essential for human health. MiRNAs appeared in the scientific literature over the past 19 years, and today are characterized by important effectors in the control of gene expression in post-transcriptional level. More recently, from 2008, miRNAs have been identified in serum or plasma and different patterns have been correlated with various disease states being studied as promising biomarkers. These circulating miRNAs have the potential to be transferred horizontally from one tissue to another, taking messages not yet well understood by the scientific community. In this project, we analyzed the level of five circulating miRNAs (miR-16, let-7a, miR-1, miR-133a, miR-206) into two plasma fractions (supernatant and vesicular) of 10 recreational athletes after running a half marathon (21 km), as well as the stability of such miRNAs after treatment with proteinase K. The results showed a decrease of miRNAs miR-16, miR-1, miR-133a, slight increase in let7a and a very large increase in miR-206 in the vesicular fraction after the marathon. The treatment with proteinase K led to a strong decrease in plasma levels of miR-16 and miR-133a in the plasma supernatant fraction indicating that this circulating plasma miRNAs may be associated with protein complexes. Otherwise, miR-let7a, miR-1 and miR-206 had no substantial reduction in plasma levels in the supernatant and vesicular plasma fractions after treatment with proteinase K, which indicates that these miRNAs circulate in plasma associated with the lipid vesicles. The results suggest that plasma levels of miR-206 associated with vesicular fraction increases strongly in response to endurance exercise, being the muscle-specific miRNA studied that showed higher response after the exercise stimulus. It would be important to understand the target genes regulated by miR-206 and also the tissue targets of microvesicles carriers of miR-206 and thus seek to understand the possible mechanisms of miRNA in adaptation to endurance exercise, as well as their participation in the benefits caused by physical exercise.

Key words: microRNA, physical exercise, quantitative PCR

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	MECANISMOS MOLECULARES DA ADAPTAÇÃO AO EXERCÍCIO FÍSICO.....	10
1.2	O TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO E O EXERCÍCIO DE ENDURANCE.....	13
1.3	EPIGENÉTICA E RNAs NÃO CODIFICADORES DE PROTEÍNAS	15
1.4	MICRORNAs (MIRNAS).....	19
1.5	BIOGÊNESE DOS MIRNA	20
1.6	ONCOMIRs miR-16 E LET-7A.....	23
1.7	MIRNAS MÚSCULO ESPECÍFICOS miR-1, -133A, -206.....	24
1.8	MIRNA NA ADAPTAÇÃO AO EXERCÍCIO FÍSICO	26
1.9	MIRNAS CIRCULANTES	26
1.10	VESÍCULAS COMO COMUNICADORAS INTERCELULARES	29
2	OBJETIVOS	32
2.1	GERAL	32
2.2	ESPECÍFICOS.....	32
3	JUSTIFICATIVA.....	33
4	HIPÓTESES	34
5	MATERIAL E MÉTODOS	35
5.1	AMOSTRAS	35
5.2	FRACIONAMENTO DO PLASMA.....	36
5.3	TRATAMENTO COM PROTEINASE K	37
5.4	EXTRAÇÃO DE RNA.....	37
5.5	ENSAIOS DE MIRNA RT-QPCR.....	38
5.6	ANÁLISE DOS DADOS DE RT-QPCR	39
5.7	CÁLCULO DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA PELO MÉTODO $2^{-\Delta\Delta Ct}$	40
6	RESULTADOS.....	44
6.1	CURVAS DE EFICIÊNCIA DOS MIRNA ESTUDADOS.....	44
6.2	QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DOS ONCOMIRs miR-16 E LET7A NAS FRAÇÕES PLASMÁTICAS APÓS A CORRIDA	46
6.3	QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DOS MIRNAS MÚSCULO ESPECÍFICO miR-1, -133A E -206 NAS FRAÇÕES PLASMÁTICAS APÓS A CORRIDA	47
6.4	QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DOS ONCOMIRs miR-16 E LET7A APÓS TRATAMENTO COM PROTEINASE K	49
6.5	QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DOS MIRNAS MÚSCULO ESPECÍFICOS miR-1, -133A, -206 APÓS TRATAMENTO COM PROTEINASE K.....	51

7	DISCUSSÃO	54
7.1	PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES SOBRENADANTE E VESICULAR.	54
7.2	QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DOS ONCOMIRS miR-16 E LET7A NAS FRAÇÕES PLASMÁTICAS APÓS A CORRIDA	54
7.3	QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DOS MIRNAS MÚSCULO ESPECÍFICO miR-1, -133A E -206 NAS FRAÇÕES PLASMÁTICAS APÓS A CORRIDA	55
7.4	QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DOS ONCOMIRS miR-16 E LET7A APÓS TRATAMENTO COM PROTEINASE K	58
7.5	QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DOS MIRNAS MÚSCULO ESPECÍFICOS miR-1, -133A, -206 APÓS TRATAMENTO COM PROTEINASE K	60
8	CONCLUSÕES	63
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1 Introdução

1.1 Mecanismos moleculares da adaptação ao exercício físico

A prática da atividade física aeróbica regular é reconhecida como um dos principais componentes para a promoção da saúde, prevenção de um conjunto de doenças crônicas e até no tratamento de algumas delas (BLAIR et al., 1993; BOOTH; TSENG, 1995; MOKDAD et al., 2004). Em humanos, os mecanismos moleculares envolvidos na adaptação física ao exercício evoluíram em um ambiente onde a atividade física era uma constante, como necessidade para a caça e/ou coleta de alimentos. Neste ambiente, ciclos de saciedade e fome, eram alternados com ciclos de intensa atividade física e repouso. Neste contexto evolucionário tem-se a hipótese de seleção de genótipos econômicos (do inglês *thrifty genotypes*), ou seja, genótipos eficientes na aquisição e/ou utilização de alimentos (NEEL, 1962). No entanto, desde o desenvolvimento da agricultura, a partir da revolução industrial e, mais recentemente, pela revolução tecnológica, tem-se uma clara mudança no padrão de atividade física em populações humanas. Esta nova norma, maximizada nos últimos 50 anos tem sido marcado por inatividade física e alta ingestão calórica (HAWLEY, J. A. H. J. A., 2009). Logo, o sedentarismo e a alta ingestão calórica são condições da vida moderna para as quais não estamos genomicamente adaptados como população (BOOTH et al., 2002; BOOTH et al., 2000). Um genoma humano que evoluiu moldado pela atividade física, responde como consequência de uma vida sedentária, com um padrão de expressão gênica que predispõe às doenças crônicas, como diabetes tipo 2, aterosclerose e câncer (BOOTH et al., 2002; BOOTH et al., 2000; CHAKRAVARTHY; BOOTH, 2004). Embora a etiologia destas doenças seja extremamente heterogênea, o desenvolvimento e prevenção delas podem depender do ambiente (BOOTH et al., 2000). Estudos recentes mostraram que a prática de atividade física reduz a mortalidade em 52%, a mortalidade associada ao câncer em 29% e reduz o risco de desenvolver doenças cardiovasculares em 50% (KATZMARZYK; CHURCH; BLAIR, 2004; MYERS et al., 2004; WESSEL et al., 2004). Dado ao aumento da incidência de tais doenças na população, principalmente de problemas cardiovasculares que são apontados como a principal causa de morte no mundo (GARCIA et al., 2007), o exercício torna-se um grande aliado para ajudar a impedir o aumento dessas doenças (HAWLEY, J. A.; HOLLOSZY, 2009).

Muito pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos nas adaptações metabólicas, estruturais e fisiológicas em resposta ao exercício físico, nem sobre a potencial

relação desses mecanismos com as melhorias observadas no estado geral de saúde física e mental daqueles que praticam exercícios regularmente (WISLØFF et al., 2005).

Os resultados do exercício físico, que consiste na atividade física estruturada, planejada e repetitiva a fim de melhorar uma condição física são conhecidos pela mudança no consumo de combustível pelo músculo passando de ácidos graxos não esterificados (AGNE) para uma mistura de AGNE, glicose e glicogênio muscular. O glicogênio muscular é a principal fonte de energia durante as fases iniciais do exercício, enquanto que conforme o exercício vai aumentando, a contribuição da glicose circulante e particularmente AGNE tornam-se mais importantes com o esgotamento gradual do glicogênio (SIGAL et al., 2004).

A resposta molecular causada por uma única sessão de exercício resistido (RE), destinado a induzir a hipertrofia e ativar mecanismos miogênicos e anabólicos resultando no aumento do tamanho da fibra muscular, aumenta o nível de RNA mensageiro (mRNA) dos genes *IGF binding protein-4*, *MyoD*, *myogenin*, *cyclin* e *p21-Waf1* (BICKEL et al., 2005).

Entre os mecanismos moleculares envolvidos no exercício de endurance, que está relacionado com o aumento na capacidade aeróbica do indivíduo e correspondente aumento na expressão de enzimas oxidativas e fatores de transcrição necessários à biogênese de mitocôndrias, podem-se destacar dois grupos de reguladores transcricionais (WISLØFF et al., 2005). O primeiro grupo compreende os fatores de transcrição nucleares, tais como *nuclear respiratory factors* (NRF) 1 e 2 e *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPAR α) que se ligam especificamente a uma sequência do DNA. O segundo grupo, conhecido como co-ativadores transcricionais, alteram a transcrição sem se ligarem diretamente ao DNA. O co-ativador *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ) da família de proteínas (PGC) foi identificada como a família central dos co-ativadores transcricionais envolvidos na indução de biogênese mitocondrial (BAAR, 2004; JOSEPH et al., 2006).

A expressão gênica envolvida na biogênese mitocondrial é regulada em nível transcricional e pós-transcricional onde *PGC-1 α* é um importante co-ativador de genes nucleares que codificam proteínas mitocondriais, enquanto que o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) regula a transcrição de genes mitocondriais assim como a replicação do genoma mitocondrial. Compreender os mecanismos pelos quais o exercício afeta a biogênese mitocondrial pode ajudar a entender se o exercício pode ser utilizado no tratamento de doenças metabólicas que envolvam as mitocôndrias (JOSEPH et al., 2006).

O exercício de endurance aumenta também o nível de enzimas de oxidação de ácidos graxos e do transportador de glicose GLUT4 estimulado por insulina, e desloca proteínas contráteis e regulatórias para suas isoformas mais eficientes (BAAR, 2004).

Apesar do conhecimento desses mecanismos moleculares envolvidos na adaptação ao exercício, ainda não está clara a diferença na variação da adaptação entre indivíduos respondedores e não respondedores ao exercício. Com a expansão de pesquisas genômicas, vêm sendo estudados fatores genéticos individuais relacionados a essas respostas, porém poucos genes foram conhecidos como efetivamente contribuindo aos mecanismos relacionados à atividade física. Evidências recentes mostram que possivelmente muitos genes com efeitos pequenos podem contribuir para características complexas, o que leva a necessidade de uma abordagem menos centrada em genes codificadores de proteínas, já que estes são uma pequena parcela do genoma, que apresenta $>3 \times 10^9$ nucleotídeos e cuja função ainda não é totalmente compreendida (ROTH, 2011).

Para isso, estão sendo estudadas diferenças na expressão de RNAs não codificadores de proteínas, em especial de microRNAs (miRNA) cuja principal função resulta em silenciamento gênico pós-transcricional, entre respondedores e não respondedores a um programa de treinamento de força. Alguns dos miRNAs conhecidos podem regular vários mRNAs alvos, tornando este processo um dos mais complexos reguladores gênicos. Vários grupos mostraram recentemente a importância potencial da regulação de miRNA em adaptações ao exercício no músculo esquelético, mostrando ser uma área promissora de investigação. Por exemplo, miRNAs foram encontrados envolvidos na resposta ao treinamento e destreinamento ao exercício aeróbico em seres humanos, assim como à sobrecarga funcional (DAVIDSEN et al., 2011).

Apesar de ter sido pouco demonstrada a expressão anormal de miRNAs associados com a adaptação ao exercício, é consenso de que eles desempenham um papel importante no desenvolvimento muscular em resposta ao estresse causado pela atividade física (NIELSEN et al., 2010; VAN ROOIJ; LIU; OLSON, 2008), e também pelo fato que já foram descritos miRNAs específicos presentes em músculo esquelético e cardíaco (MCCARTHY, J.J., 2008; MCCARTHY, J. J.; ESSER, 2007). Tanto em roedores e humanos, os efeitos do exercício físico sobre a expressão de diferentes genes têm sido investigados por meio de microarranjos ou pela análise de expressão individual de mRNAs utilizando métodos de PCR quantitativo (qPCR) (BRADBURY, 2003).

1.2 O tecido muscular esquelético e o exercício de endurance

A menor unidade contrátil do músculo esquelético é a fibra muscular ou miofibrila, que é uma célula cilíndrica longa que contém muitos núcleos, mitocôndrias e sarcômeros (Figura 1). Cada fibra muscular está rodeada por uma fina camada de tecido conectivo chamado endomísio. Cerca de 20 a 80 destas fibras musculares são agrupadas em um arranjo paralelo chamado fascículo muscular ou feixe de fibras que é encapsulado pelo perimísio, que é mais espesso do que o epimísio, juntando cada uma das fibras musculares empacotadas. Um músculo distinto é formado pelo envolvimento de um grande número de fascículos musculares em uma bainha externa colagenosa de espessura que se estende desde os tendões, chamado epimísio (KORTHUIS, 2011).

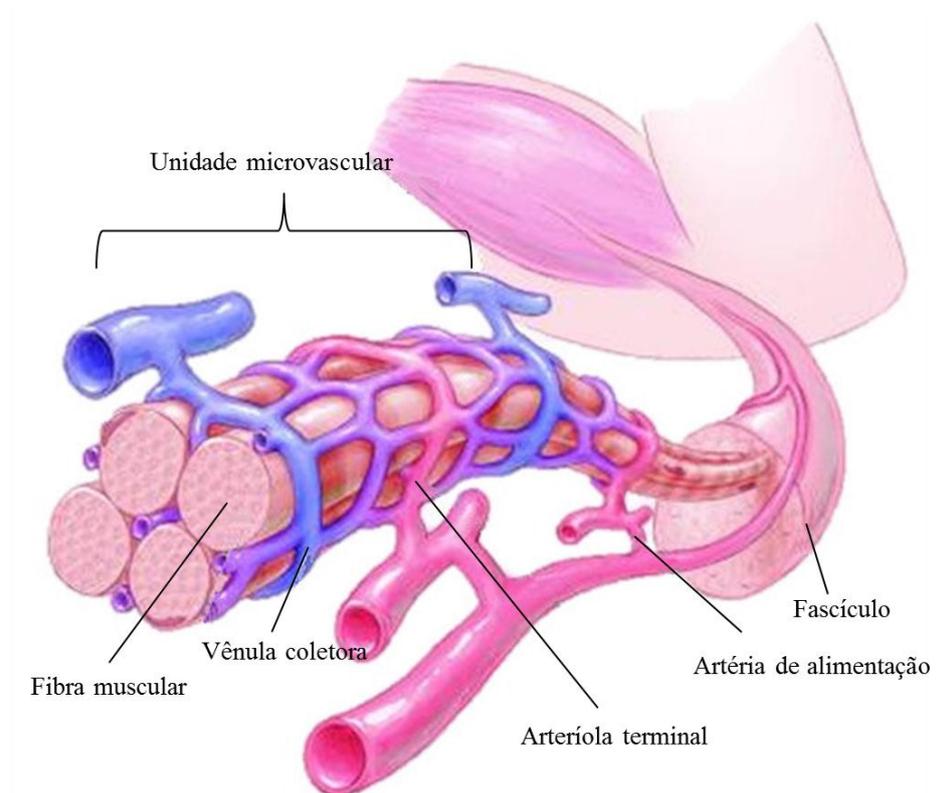


Figura 1: Estruturas anatômicas gerais do músculo esquelético e seu suprimento vascular. Adaptado de (KORTHUIS, 2011).

Os exercícios físicos que moldam o tecido muscular são geralmente agrupados em duas grandes categorias, aqueles que aumentam a resistência muscular e aqueles que aumentam a força muscular. A resistência muscular, como a capacidade muscular para sustentar esforços repetidos de relativamente baixa intensidade durante longos períodos de

tempo, está também relacionada com a capacidade aeróbia do corpo, ou seja, a eficiência do sistema cardiovascular e respiratório em assumir o transporte de oxigênio. Exercícios altamente repetitivos de baixa carga favorecem a adaptação dos músculos a um fenótipo resistente à fadiga (MARINI; VEICSTEINAS, 2010).

Como uma consequência do treinamento de endurance, um aumento na capacidade oxidativa do músculo esquelético é observada. Tal adaptação metabólica é o resultado de cascatas bioquímicas que influenciam a expressão gênica e que é desencadeada pelas alterações nos níveis de cálcio intramusculares, a disponibilidade de energia, a concentração plasmática de ácidos graxos livres, estresse mecânico e hipóxia local. O aumento na capacidade oxidativa muscular envolve múltiplos caminhos e é conseguido através da utilização mais sustentada de ácidos graxos, biogênese mitocondrial e níveis mais elevados de enzimas do metabolismo oxidativo, melhoria no transporte de glicose e neo-angiogênese (MARINI; VEICSTEINAS, 2010).

A utilização aprimorada de lipídios durante o exercício de moderada intensidade nos músculos de indivíduos que treinam endurance foi observada, com um aumento seletivo nos níveis de mRNA de enzimas envolvidas na metabolização de ácidos graxos intramusculares e na sua oxidação. Em particular, em atletas de endurance, tem sido relatado que o conteúdo de *Medium* e *Very Long Chain-específica Acil-CoA Desidrogenases* (MDAC e VLDAC), envolvidos na beta-oxidação de ácidos graxos e de *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* -(PPAR α) no músculo esquelético dobrou, apesar de um aumento limitado em todo o corpo e na oxidação de ácidos graxos plasmáticos. Também foi relatado que o treinamento de endurance em ratos e o exercício agudo em seres humanos aumentam a expressão de PPAR β/δ , que é várias vezes mais abundante do que PPAR α ou PPAR γ no músculo esquelético e são expressas em níveis mais elevados em estresse oxidativo lento comparado com músculos glicolíticos rápidos. As três isoformas PPAR são membros de uma superfamília de receptores nucleares que se ligam a heterodímero de DNA com *retinoid X receptors* (RXRs). Nos mamíferos eles funcionam como sensores metabólicos, sendo ativados por lipídios e afetando o metabolismo lipídico. Eles controlam um grande número de genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo mitocondrial, incluindo as proteínas codificadas responsáveis pelo transporte e ativação de ácidos graxos, β -oxidação mitocondrial, e desacoplamento energético (MARINI; VEICSTEINAS, 2010; RODGERS et al., 2008).

A mitocôndria parece ser a organela chave envolvida na adaptação metabólica ao treinamento de endurance. Elas hospedam numerosas proteínas envolvidas na beta oxidação,

bem como todas as proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa. O conteúdo de DNA mitocondrial aumenta no músculo de atletas de endurance, juntamente com o nível de fatores de transcrição nucleares (NRF-1, NRF-2 e TFAM) que controlam genes mitocondriais codificados no núcleo. Como resultado, RNAs mitocondriais transcritos no núcleo e nas mitocôndrias têm um aumento coordenado em atletas de endurance (MARINI; VEICSTEINAS, 2010). Os fatores de transcrição nucleares que promovem a biogênese mitocondrial são ativados pelo co-ativador transcricional PGC1- α . O nível de expressão de PGC1- α é mais baixos em fibras rápidas do que em lentas, porém o exercício de endurance aumenta rapidamente a sua expressão, permitindo que PGC1- α estimule a biogênese mitocondrial e a síntese de enzimas oxidativas, tornando assim músculos de contração rápida mais resistentes à fadiga. A expressão de PGC1- α é controlada positivamente por várias moléculas, como as espécies reativas de oxigênio (ROS), caucineurina, proteínas quinases dependentes de calmodulina/ Ca^{2+} (CaMKs), fatores de transcrição *myocyte enhancer factor-2* (MEF2), que em muitos tecidos está envolvido na resposta ao estresse, da proteína quinase p38 ativada por mitógeno (p38MAPK), que por sua vez requer a atividade do fator de transcrição ATF2, e AMP quinase que controla as vias que levam a um melhor aproveitamento da energia disponível, incluindo a passagem da via glicolítica a via oxidativa. Esta última atividade é desencadeada por sinais de escassez de energia (MARINI; VEICSTEINAS, 2010).

1.3 Epigenética e RNAs não codificadores de proteínas

O genoma humano possui cerca de três bilhões de bases que codifica, direta ou indiretamente, as instruções para a síntese de quase todas as moléculas que formam cada célula humana, tecidos e órgãos. Por meio do projeto *The Encyclopedia of DNA Elements* (ENCODE) espera-se analisar cada uma das sequências de DNA codificadoras de proteínas geradas pelo sequenciamento do genoma humano que forneceu sequências de DNA altamente precisas para cada um dos 24 cromossomos. No entanto, atualmente, a compreensão das porções codificadoras de proteínas ainda é incompleta, e menos ainda em relação aos transcritos não codificadores de proteínas e aos elementos genômicos que temporal e espacialmente regulam a expressão gênica. Para compreender o genoma humano, e consequentemente os processos biológicos orquestrados por ele, as maneiras pelas quais mutações e erros no genoma podem originar doenças, é preciso uma visão mais holística da informação codificada (BIRNEY et al., 2007).

A partir das experiências de Oswald Avery, Colin MacLeod e Maclyn McCarty ficou conhecido que o DNA é o fator transformante de cepas avirulentas de bactérias pneumococos R (*rough*) em cepas virulentas S (*smooth*) ao contrário do que se pensava na época, que as proteínas desempenhavam essa função (AVERY; MACLEOD; MCCARTY, 1944). Em seguida, Hershey-Chase nos anos 1950, confirmaram que o DNA é realmente o material hereditário, para isso eles mostraram que vírus quando infectam bactérias inserem apenas o DNA e não proteínas como se achava anteriormente (HERSHEY; CHASE, 1952). É consenso na comunidade científica que as nossas características físicas, fisiológicas, nossos traços hereditários e algumas doenças genéticas são determinadas por processos altamente regulados que envolvem genes no DNA que são transcritos em RNAs mensageiros e em seguida traduzidos em proteínas. Essa passagem de DNA até proteína é regulada em vários níveis, entre eles, a metilação do DNA, as modificações pós-traducionais em proteínas histonas e consequente modificação na estrutura da cromatina, a ligação de fatores de transcrição ao DNA, o processamento que sofre o RNA mensageiro (*splicing*) e as interações entre RNAs não codificadores de proteínas (ncRNA) ao DNA e RNA mensageiros. Provavelmente os nossos traços hereditários são determinados tanto por meio de mudanças na regulação como diferenças no conteúdo de genes (RANEY et al., 2011).

No início de 1940 o termo Epigenética foi introduzido pelo biólogo do desenvolvimento Conrad Waddington, como o ramo da biologia que estuda as interações entre genes e seus produtos que fazem o fenótipo visível. No sentido original da sua definição, epigenética se referia a todas as vias moleculares que modulam a expressão de um genótipo em um fenótipo particular (DUPONT; ARMANT; BRENNER, 2009). A história da epigenética é ligada ao estudo da evolução e do desenvolvimento, mas durante os últimos 50 anos, o significado do termo “epigenética” tem se submetido a uma evolução que aumentou significativamente o conhecimento científico dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação da expressão gênica em eucariotos. Atualmente a epigenética pode ser definida como o estudo das mudanças nas funções gênicas herdáveis meióticas e/ou mitóticas que não podem ser explicadas pelas mudanças nas sequências de DNA (ALLIS; JENUWEIN; REINBERG, 2007). Grande parte da pesquisa epigenética está convergindo para o estudo de RNAs não codificadores de proteínas, modificações covalentes e não covalentes de DNA e de proteínas histonas e os mecanismos pelos quais essas modificações influenciam na estrutura geral da cromatina (GOLDBERG; ALLIS; BERNSTEIN, 2007).

A maioria dos RNAs não codificadores (ncRNAs) são conhecidos por cumprirem funções relativamente específicas nas células, tais como o RNA ribossomal (rRNA) e o RNA

transportador (tRNA) que estão envolvidos na tradução do mRNA. Os pequenos RNAs nucleares (snRNAs) são conhecidos por participarem do *splicing* e os pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs) estão envolvidos na modificação do rRNAs. O dogma central da biologia molecular, desenvolvido a partir do estudo de organismos simples, como *Escherichia coli*, tem mostrado que o RNA funciona principalmente como um intermediário informacional entre uma sequência de DNA “gene” e a sua proteína codificada. O conhecimento adquirido é que a maioria da informação genética responsável por especificar a forma biológica e o fenótipo é expressa em proteínas, que não só cumprem diversas funções catalíticas e estruturais, mas também regulam a atividade do sistema de várias formas. Isto é verdadeiro em procariotos e é também verdadeiro para os eucariotos. Porém, os eucariotos “superiores” apresentam extensas sequências de DNA que não codificam proteínas e elementos reguladores *cis-acting*. Estas sequências estão localizadas, na grande maioria, em regiões intrônicas e intergênicas e foram consideradas vestígios que se acumularam ao longo da evolução e possivelmente se originaram durante a montagem precoce de genes e durante a inserção de elementos genéticos móveis (MATTICK; MAKUNIN, 2006). Evidências recentes indicam que a maioria das sequências do genoma eucariótico é transcrito e que a proporção de transcrição de genes não codificadores de proteínas aumenta com o aumento da complexidade (Tabela 1) (FRITH; PHEASANT; MATTICK, 2005).

Tabela 1. Aumento da transcrição de sequências não codificadoras de proteínas em Metazoários. Adaptado de (FRITH et al., 2005).

<i>Organismo</i>	<i>Nº de genes codificadores de proteínas</i>	<i>Tamanho do genoma (Mb)</i>	<i>Sequências codificadoras</i>		<i>Sequências UTR</i>		<i>Total de sequências não codificadoras transcritas</i>		<i>Relação entre sequências codificadoras e não codificadoras</i>
			<i>Mb</i>	<i>%</i>	<i>Mb</i>	<i>%</i>	<i>Mb</i>	<i>%</i>	
<i>Genoma total</i>									
Humano	~20-25000	2851	34	1.2	32	1.1	1619	57	47/1
Camundongo	~20-25000	2490	31	1.3	26	1.1	1339	54	43/1
Mosca-da-fruta	~13500	120	22	18	6.4	5.3	53	44	2.4/1
Nematoide	~19000	100	26	26	0.4	0.4	33	33	1.3/1
<i>Porção do genoma não repetitiva</i>									
Humano		1455	33	2.3	26	1.8	867	60	27/1
Camundongo		1422	29	2.0	22	1.6	811	57	28/1
Mosca-da-fruta		109	21	20	6.2	5.7	48	44	2.2/1
Nematoide		86	25	29	0.3	0.4	26	31	1.1/1

A ideia de que o transcriptoma é proveniente exclusivamente de genes codificadores de proteínas e alguns RNAs não codificadores específicos como – snRNAs, snoRNAs e tRNAs, rRNAs – tem sido deixada de lado, já que estudos indicam que a RNA polimerase II pode ser encontrada em quase qualquer região genômica. A transcrição “pervasiva” é generalizada e, longe de ser um processo inútil, tem um papel crucial no controle da expressão gênica e plasticidade genômica. Como exemplo, mais de 85% do genoma de *S. cerevisiae* é transcrito (BERRETTA; MORILLON, 2009).

O desenvolvimento de arranjos de alta resolução e mais recentemente o sequenciamento em larga escala de RNA, aliado a técnica de imunoprecipitação de cromatina permitiram uma melhor caracterização do transcriptoma. Estas novas tecnologias revelaram que o cenário da transcrição em eucariotos “superiores” é muito mais complexo do que se tinha antecipado, com uma elevada proporção de transcritos provenientes de regiões intergênicas, que anteriormente foram pensadas não ativadas transcricionalmente, e em orientações opostas aos transcritos codificadores (antisense). Também foi encontrada atividade transcricional em regiões que não são responsáveis pela codificação de genes em

leveduras. O nível inesperado de complexidade levou à noção de transcrição generalizada ou pervasiva, que se refere ao fato de que os transcritos não estão restritos a características funcionais bem definidas, tais como “genes” conhecidos anteriormente por codificarem proteínas (JACQUIER, 2009). O genoma humano é pervasivamente transcrito e produz muitos milhares de RNAs não codificadores de proteínas de função regulatória (ncRNA), incluindo microRNAs, pequenos RNAs de interferência, complexos de proteínas Piwi que interagem com RNA (piwiRNA) e várias classes de ncRNAs longos (TAFT et al., 2010).

1.4 microRNAs (miRNAs)

Os microRNAs (miRNAs) pertencem a uma classe de pequenos RNAs não-codificadores de filamento único, que contém aproximadamente 22 nucleotídeos (BARTEL, 2004). MiRNAs estão envolvidos na regulação da expressão gênica pós-transcricional por meio da ligação à região 3' não traduzida (UTR), sequência codificadora ou 5'UTR de RNAs mensageiros (mRNA) alvos e conduzindo à inibição da transcrição ou degradação do mRNA em animais, plantas e vírus (ALMEIDA; REIS; CALIN, 2011; DAVIS-DUSENBERY; HATA, 2010). Nos seres humanos, prevê-se que a expressão de aproximadamente 50% de genes codificadores de proteínas são regulados por miRNAs (ZHOU, R. et al., 2012). Também foi mostrado que miRNAs de plantas adquiridos durante a alimentação são capazes de atravessar o trato gastro intestinal e regular mRNAs dentro de tecidos de mamíferos (ZHANG, L. et al., 2012). Desde a sua descoberta, estão cadastrados hoje 18.226 entradas representando precursores de miRNAs expressando 21.643 miRNAs maduros em 168 espécies, e em *Homo sapiens* estão cadastrados 1.527 precursores e 1.921 miRNAs maduros existentes (<http://www.mirbase.org>, acessado dia 10/04/12) (KOZOMARA; GRIFFITHS-JONES, 2011).

Os miRNAs controlam genes envolvidos em vários processos biológicos, entre eles, apoptose, proliferação, diferenciação, metástase (ALMEIDA et al., 2011) e em células de mamíferos desempenham papéis importantes no desenvolvimento humano, na diferenciação celular, homeostase, na adaptação ao meio ambiente, ontogênese, e nas interações das células hospedeiras com agentes patogênicos (HA, 2011 2; MA et al., 2011 3).

A caracterização do primeiro miRNA - lin-4 foi feita em 1989 e ocorreu no nematoide *C. elegans*. A validação posterior de lin-4 como um RNA não codificador complementar a região 3'UTR do gene lin-14 ocorreu em 1993. A caracterização funcional de lin-4 como tendo um efeito de repressão na tradução do gene lin-14 abriu um importante campo de

investigação (SHIRDEL et al., 2011). Em seguida, muitos experimentos *in vitro* e de previsão computacional destinados a revelar as relações entre os miRNA e seus alvos e entender seus efeitos na regulação da expressão gênica foram feitos tendo como resultado a descoberta de um segundo miRNA também em nematoide, o miR-let7, que tem como alvo os genes lin-41 e hbl-1, a partir da descoberta do miR-let7 o conceito de miRNAs deu o salto de nematoides para espécies mais complexas, uma vez que a sequência de let-7 apresenta homologia conhecida em seres humanos (SHIRDEL et al., 2011).

1.5 Biogênese dos miRNA

Os miRNAs são codificados em diversas regiões do genoma incluindo unidades codificadoras e não codificadoras de proteínas. Aproximadamente 50% dos miRNAs são derivados de transcritos de RNA não codificadores, enquanto que aproximadamente 40% estão localizados dentro de íntrons de genes codificadores de proteínas. A maioria dos miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II (RNA polII) e apresentam a marca 7-metil guanosina na extremidade 5' e cauda poli (A) na extremidade 3', semelhante aos mRNAs. A RNA pol III também foi encontrada gerando transcritos de um subconjunto de miRNAs (DAVIS; HATA, 2009).

A biogênese dos miRNA em humanos é um processo que ocorre em duas etapas, com eventos de clivagem nucleares e citoplasmáticas realizados por duas ribonucleases III, *Drosha* e *Dicer*. O gene de miRNA é transcrito produzindo um miRNA primário (pri-miRNA) que é processado em um precursor de miRNA (pré-miRNA) e posteriormente em um duplex de miRNA (miRNA/miRNA*, a fita passageira é designada com asterisco), em seguida ocorre a liberação do miRNA maduro (MACFARLANE; MURPHY, 2010)

Os transcritos primários longos de miRNA (pri-miRNAs), geralmente apresentam milhares de nucleotídeos e são submetidos a duas clivagens sequenciais para tornarem-se miRNAs maduros de 22nt (figura 2). O primeiro passo do processamento do miRNA é catalisado no núcleo pela RNase III, *Drosha*. Os pri-miRNAs contém uma estrutura em forma de grampo característica. A ribonuclease *Drosha* cliva na base do “grampo” para gerar um pré-miRNA de 60-100nt com a característica de 2nt que não se sobrepõem no final 3'. O complexo microprocessador *Drosha* inclui um cofator, o *DiGeorge syndrome critical region 8* (DGCR8), que é capaz de promover a clivagem eficaz de pri-miRNA *in vitro* (DAVIS-DUSENBERY; HATA, 2010). A atividade de DGCR8 pode controlar níveis celulares de miRNAs e foi demonstrado que a diminuição da DGCR8 pode causar uma deficiência na

produção de miRNA, levando a aumentos significativos do miRNA primário e concomitante diminuição dos miRNAs maduros funcionais. Logo, o *knockdown in vivo* de DGCR8 pode ser utilizado como uma ferramenta molecular para inibir a síntese de miRNA maduros e assim revelar processos fisiologicamente dependentes de miRNAs (SCHOFIELD et al., 2011).

A *Drosha* juntamente com *DGCR8* decompõem inicialmente transcritos primários longos de miRNA em precursores de miRNAs (pré-miRNA) de aproximadamente 70 nucleotídeos com grampo. Estes, por sua vez, são exportados do núcleo e processados pela *Dicer* em miRNAs maduros funcionais (SCHOFIELD et al., 2011).

Os pré-miRNAs são então transportados para o citoplasma pelo canal Exportina 5 onde a RNase citoplasmática *Dicer* juntamente com a proteína *transactivating response RNA-binding protein* (TRBP) clivam os pré-miRNA em um duplex de miRNA maduro longo de 20-25 pares de bases (HAVENS et al., 2012). O miRNA de fita dupla, em seguida, se liga ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). A fita passageira do duplex de miRNAs é degradada ao passo que a fita madura de miRNA atua como um guia para direcionar o RISC aos mRNA alvos, geralmente por meio da sequência em sua região 3'UTR (FREZZETTI et al., 2011). Geralmente, a fita retida no RISC é a fita que tem a menor estabilidade no pareamento de bases no final 5' no duplex miRNA/miRNA*. A fita passageira (miRNA*) não é sempre subproduto da biogênese do miRNA e também pode ser funcionalmente incorporado ao complexo miRISC e funcionar como miRNAs (KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010). O complexo RISC atua com os membros da família de proteínas Argonata, produzindo um complexo funcional para o direcionamento do mRNA através de emparelhamento de base direta. Os resultantes híbridos miRNA/mRNA podem alterar a expressão da proteína do mRNA alvo de diferentes mecanismos, tais como a repressão da tradução e degradação do mRNA (HAVENS et al., 2012)

Nos seres humanos, existem oito classes de complexos RISC, que são baseadas na composição proteica centrada em torno das quatro proteínas Argonata, Ago 1-4. Análises genômicas indicam que as proteínas Argonata evoluíram a partir de proteínas de iniciação da tradução, daí o sinônimo eucariótico fator de iniciação da tradução. A Ago2 é a única proteína Argonata com atividade "*slicer*" capaz de catalisar a clivagem do mRNA. No entanto, todas as quatro proteínas Ago se associam com miRNA e parecem funcionar no silenciamento gênico. Não é bem estabelecido se existem mecanismos de silenciamento particulares associados a cada proteína Argonata. Os principais componentes do complexo RISC são *Dicer*, *Ago2*, *PACT* e *TRBP*. Os RISCs que carregam miRNA são designados miRNA

contendo complexo ribonucleoproteína (miRISC ou miRNP) (MACFARLANE; MURPHY, 2010).

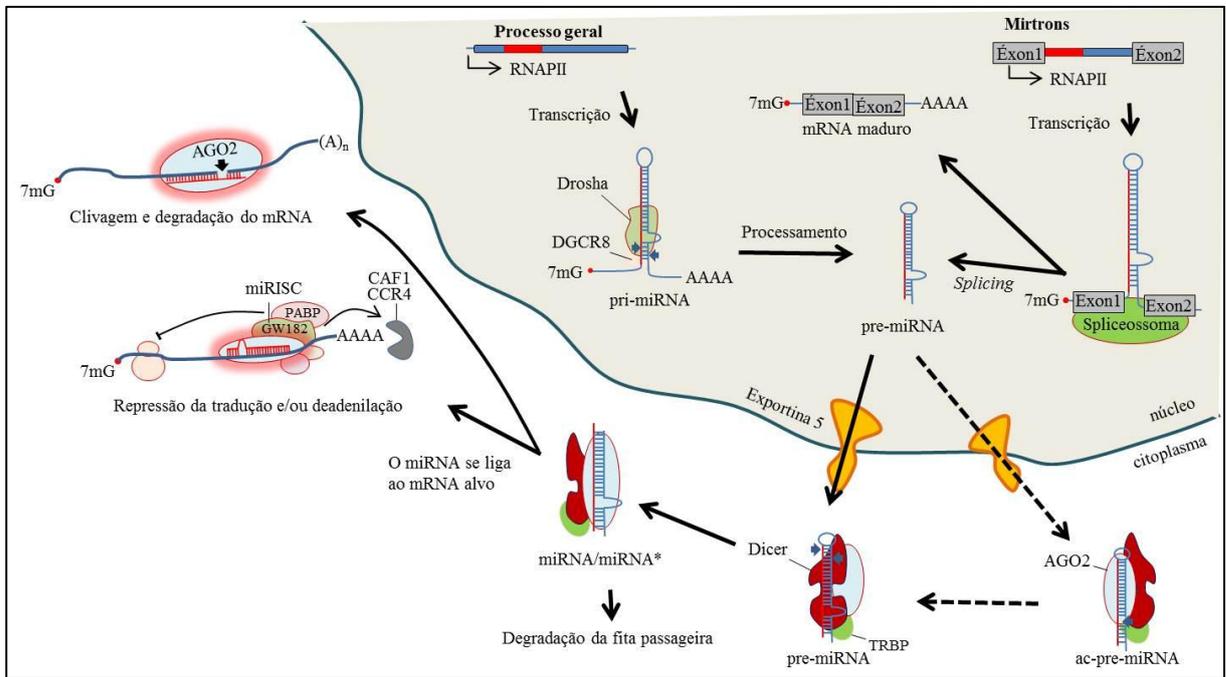


Figura 2: Os microRNAs (miRNAs) são processados a partir da RNA polimerase II (RNAPII) em transcritos específicos de genes independentes (processo geral) ou a partir de íntrons de genes codificadores de proteínas. Na via geral, o processamento do precursor primário (Pri-miRNA) ocorre em duas etapas, catalisadas pelas enzimas, *Drosha* e *Dicer*, que operam em conjunto com proteínas ligantes a RNA dupla fita (dsRBPs), por exemplo DGCR8 e proteína (TRBP) em mamíferos. No primeiro passo, o complexo *Drosha*-DGCR8 processa o pri-miRNA no núcleo em um precursor de aproximadamente 70 nucleotídeos com grampo (pré-miRNA), que é exportado para o citoplasma. Alguns pré-miRNAs são produzidos a partir de íntrons muito curtos (Mirtrons) como resultado de *splicing*, pulando assim a etapa de clivagem da *Drosha*-DGCR8. Em ambos os casos, a clivagem pela *Dicer*, juntamente com TRBP no citoplasma produz um duplex miRNA/miRNA* de aproximadamente 20 pb. Após o processamento, uma fita do duplex miRNA/miRNA* (a fita guia) é preferencialmente incorporada no complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC), enquanto que a fita passageira, ou miRNA*, é liberada e degradada. GW182: proteína de glicina-triptofano de 182 kDa. 7mG: 7 metilguanossina. PABP: proteína de ligação poli (A). Adaptado de (KROL et al., 2010).

1.6 OncomiRs miR-16 e Let-7a

Várias famílias de miRNA têm atraído a atenção por seu envolvimento na regulação do ciclo celular e pela sua regulação diferencial em células cancerosas. Um exemplo particularmente bem estudado é a família altamente conservada miR-16, composta por seis miRNAs maduros (miR15a/b, miR-16, miR-195, miR-424 e miR-497) que são transcritos a partir de quatro *loci* genômicos. A deleção ou a *down-regulation* de miR-15a e miR-16 em casos de leucemias linfocíticas crônicas de células B (B-CLL) sugeriu pela primeira vez uma associação desta família de miRNAs com câncer. Além disso, relatos apoiam um papel mais amplo desta família como potenciais supressores de tumor uma vez que seus membros são frequentemente reprimidos em outros tipos de câncer, como câncer colorretal e adenocarcinomas de pulmão (RISSLAND; HONG; BARTEL, 2011). Deleções e translocações envolvendo, miR-15a e miR-16-1, localizados em um cluster em 13q14.3, foram encontradas em aproximadamente 68% de pacientes com B-CLL (LIU et al., 2008). Este papel para a família miR-16 pode ser explicado por vários dos seus mRNAs alvos: o gene anti-apoptótico BCL2, genes envolvidos na via da MAP quinase, tais como MAPK3, MAP2K1 e MAP3K4, e numerosos genes envolvidos no ciclo celular de transição G1-S, como a ciclina D1/2/3, E1 CICLINA, CDC25A e CDK6 (RISSLAND et al., 2011).

O miRNA let-7 foi descoberto em uma localização cromossômica que afeta a diferenciação terminal nas junções celulares em *C. elegans*. Nos seres humanos e camundongos, existe uma associação entre let-7a, ciclo celular e diferenciação. A inibição do miR-let7a em células A549 de câncer de pulmão aumenta a taxa de proliferação celular, enquanto que a super expressão de miR-let-7a bloqueia a progressão do ciclo celular. A super expressão de miR-let-7a em fibroblastos primários humanos causa redução da proliferação celular e o acúmulo de células na fase G2/M do ciclo celular. Em *C. elegans*, camundongos e humanos, a expressão de miR-let-7a é dificilmente detectável nas fases embrionárias, mas aumenta após a diferenciação em tecidos maduros. A família de miRNAs à qual pertence o miR-let-7 é consistentemente *down-regulated* em câncer de pulmão e em câncer de cólon. Em câncer de pulmão, baixos níveis de miR-let-7a foram relacionados com a menor sobrevivência após a recidiva (WANG, D. J. et al., 2012).

1.7 MiRNAs músculo específicos miR-1, -133a, -206

Vários miRNAs codificados dentro do genoma de mamíferos apresentam rara especificidade tecidual. Especificamente, miR-1-1, miR-1-2, miR-133a-1, miR-133a-2 são expressos quase exclusivamente no tecido do músculo estriado (músculo cardíaco e esquelético). Além disso, miR-133b e miR-206 são exclusivamente expressos no músculo esquelético (figura 3) e têm sequências *seed* que são idênticas aos miR-133a e miR-1, respectivamente. Uma vez que a sequência *seed* é criticamente importante na determinação da especificidade e funcionalidade do alvo, o músculo esquelético, essencialmente, expressa três cópias funcionais de miR-1 e miR-133 (RAO et al., 2010).

Os miRNA considerados músculo específicos (miR-1, -133a, -133b e -206) foram identificados e demonstrados como importantes na miogênese, no crescimento do músculo embrionário, no crescimento e função do músculo cardíaco (MIYACHI et al., 2010). Estes miRNAs, são induzidos durante a diferenciação de mioblastos C2C12 *in vitro*. A transfecção de miR-206 promove a diferenciação, apesar da presença de soro, ao passo que a inibição do miRNA por oligonucleotídeos *antisense* inibe a retirada do ciclo celular e diferenciação, que são normalmente induzida por privação de soro (KIM et al., 2006). Os efeitos de miR-1 e -206 são parcialmente mediados pela repressão da histona desacetilase 4 (HDAC4) e DNA polimerase α (Pol α 1), respectivamente. Alvos diretos adicionais para miR-206 como conexina 43 (Cx43), *follistatin-like 1* (Fstl1), *utrophin* (Utrn), receptor de estrogênio alfa (ER α), transcrito induzido por butirato 1 (Bind1), proteína associada a diferenciação da idade de monócito a macrófago (Mmd), e CMET foram identificados (DEY; GAGAN; DUTTA, 2011).

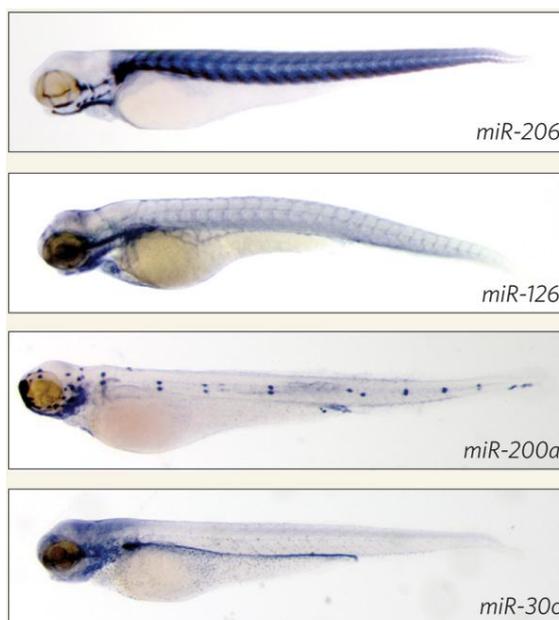


Figura 3: Alguns miRNAs são diferentemente expressos dependendo do tecido. Em embriões de *zebrafish*, os padrões de localização de miRNAs individuais indicam que a sua atividade pode ser limitada aos tecidos e órgãos em que eles são expressos. Tal como indicado pela coloração azul, o miR-206 é expresso principalmente no músculo, o miR-126 nos vasos sanguíneos e no coração, o miR-200a no sistema linha lateral (um sistema de detecção de movimento na água) e órgãos sensoriais e o miR-30c em precursor de rim. Adaptado de (GROSSHANS; FILIPOWICZ, 2008).

Foi mostrado que miR-1 tem a expressão aumentada em indivíduos com doença arterial coronariana, e que quando super expresso em corações de ratos normais ou infartados, ela agrava arritmogênese. A eliminação de miR-1 por um inibidor *antisense* em corações de ratos infartados atenua a arritmogênese. A super expressão de miR-1 diminuiu a condução e a despolarização da membrana citoplasmática pela repressão pós-transcricional do gene *KCNJ2* (que codifica o canal de K^+ subunidade Kir2.1) e do gene *GJA1* (que codifica a conexina 43), e isso provavelmente contribui pelo menos em parte para o seu potencial arritmogênico. Assim, miR-1 pode ter importantes funções patofisiológicas no coração, e é um alvo potencial anti-arrítmico (YANG et al., 2011).

Os miR-1-1 e miR-1-2 são especificamente expressos em células precursoras do músculo esquelético e cardíaco. Foi descoberto que os genes miR-1 são alvos transcricionais diretos dos reguladores de diferenciação muscular, incluindo o fator de resposta do soro, MyoD e MEF2 (ZHAO; SAMAL; SRIVASTAVA, 2005). Os mir-1 e -133 têm papéis distintos na modulação da proliferação e diferenciação do músculo esquelético em culturas de

mioblastos *in vitro* e em embriões de *Xenopus laevis in vivo*. O miR-1 promove miogênese se ligando a histona desacetilase 4 (HDAC4), um repressor transcricional da expressão do gene do músculo. Por outro lado, o miR-133 aumenta a proliferação de mioblastos reprimindo o fator de resposta sérica (SRF) (CHEN, J. F. et al., 2006).

1.8 MiRNA na adaptação ao exercício físico

No músculo esquelético, miR-1, -133a, -133b e -206 respondem juntos por quase 25% de toda a expressão de miRNAs, por isso são chamados miRNAs músculo específicos ou myomiRs (NIELSEN et al., 2010). A expressão de myomiRs é dramaticamente aumentada durante miogênese. Além disso, a expressão diferencial de myomiRs após exercícios de endurance e em músculo esquelético de diabéticos sugerem que myomiRs desempenham um papel na saúde e doença em humanos (NIELSEN et al., 2010). As diferenças na regulação de miRNAs em músculos esqueléticos de indivíduos diabéticos e saudáveis pode resultar de diferenças na sensibilidade ou sinalização à insulina, que podem ser melhoradas pelo treinamento de endurance (NIELSEN et al., 2010). Os myomiRs, que são altamente expressos *in vivo*, podem também ser regulados durante alterações no fenótipo muscular. Por exemplo, miR-1 e miR-133a são reprimidos no músculo esquelético de camundongos durante hipertrofia induzida por ablação sinérgica bilateral no músculo plantaris. Uma sessão aguda de exercícios de endurance resulta em resultado similar, aproximadamente 50% de repressão em miR-1, enquanto que não houve alteração na expressão de miR-133a. No entanto, em seres humanos, é importante ligar alterações agudas na expressão gênica com resultados fenotípicos relevantes para a intervenção, porque nem todos os indivíduos demonstram uma adaptação fisiológica robusta ou respostas moleculares ao treinamento físico. Enquanto isto tem sido claramente demonstrado para o treinamento de força, também é razoável suspeitar de um cenário semelhante em treinamento de endurance, portanto, na ausência de conhecimento de como cada indivíduo se adapta ao treinamento crônico, as respostas moleculares agudas ao exercício agudo podem ou não ser informativas (DAVIDSEN et al., 2011).

1.9 MiRNAs circulantes

Um dos primeiros estudos que mediram os níveis de miRNA no soro demonstrou que os níveis de miR-21 no soro estão associados com sobrevida livre de recidiva em pacientes com linfoma difuso de grandes células B, assim, miR-21 poderia ter potencial como um

biomarcador de diagnóstico para esta doença (KOSAKA; IGUCHI; OCHIYA, 2010; LAWRIE et al., 2008). Em seguida, outro miRNA circulante, miR-141, foi analisado e por meio da medição dos níveis séricos puderam ser diferenciados pacientes com câncer de próstata de indivíduos saudáveis. Nesse estudo, eles também demonstraram a presença de miRNAs circulantes derivados de tumor no sangue usando um modelo de rato com câncer de próstata. Além disso, estes miRNAs circulantes também foram encontrados no soro de ratos, camundongos, bezerros, fetos bovinos e cavalos, indicando que miRNAs circulantes são encontrados em várias espécies de mamíferos (KOSAKA et al., 2010; MITCHELL, P. S. et al., 2008).

Os miRNAs circulantes, presentes no soro, plasma e outros fluidos corporais podem ser potencialmente utilizados como biomarcadores não-invasivos para diversas doenças humanas, uma vez que eles podem suportar ciclos repetitivos de congelamento e descongelamento (MITCHELL, P.S. et al., 2008) (CORTEZ et al., 2011; TURCHINOVICH et al., 2011). Alguns miRNAs específicos de tecidos com câncer são capazes de ser liberados na circulação e esses miRNAs circulantes presentes no soro ou plasma podem ser usados como novos biomarcadores para diversos tipos de câncer. No entanto, um método para medir a quantidade absoluta de miRNA no sangue ainda não está bem estabelecido, devido a falta de controle estável de RNAs neste tecido, especialmente sob condições de doença (CHENG et al., 2010).

A notável estabilidade de miRNAs em amostras de plasma sanguíneo levantou questões importantes sobre o mecanismo pelo qual os miRNAs são protegidos da atividade de RNases endógenas. Resultados preliminares mostraram que miRNAs têm uma incomum alta estabilidade em tecidos fixados em formalina, plasma e soro. Esta estabilidade pode ser explicada pela associação de miRNA à lipoproteínas de alta densidade (HDL), proteção por meio de outras moléculas (RNA- complexo de proteínas), modificações nos miRNAs que os tornam resistentes a atividade de RNases endógenas ou associação dos miRNAs à microvesículas, tais como exossomas (MITCHELL, P.S. et al., 2008).

A hipótese de modificação nos miRNAs circulantes baseia-se principalmente na comparação entre miRNAs circulantes e miRNAs celulares/teciduals. Uma vez que o miRNA do mesmo indivíduo é mais estável no soro ou plasma do que na célula/tecido, em termos de resistência à digestão por RNase, é razoável sugerir que estes miRNAs circulantes podem sofrer modificações. As modificações gerais encontradas em miRNAs incluem metilação, adenilação e uridilação. Nas plantas, a metilação e a adenilação de miRNA desempenham papéis críticos na estabilização e na regulação das funções de miRNAs. Foi mostrado que a 3'

adenilação mediada pela enzima poli(A) polimerase GLD-2 citoplasmática é capaz de estabilizar seletivamente miRNAs de mamíferos, no entanto, não se sabe se miRNAs circulantes são metilados ou adenilados. A uridilação de miRNA nos tecidos também foi demonstrada modificando a função de miRNAs, mas uridilação de miRNAs circulantes, não foi relatada (ZEN; ZHANG, 2010).

Lipídeos específicos encontrados em lipoproteínas tais como fosfatidilcolina, têm sido mostrados em complexos ternários com os ácidos nucléicos. Lipoproteínas de alta densidade (HDL) podem entregar miRNAs de células receptoras com consequências funcionais na regulação gênica (VICKERS et al., 2011). Outros estudos utilizando centrifugação diferencial e cromatografia de exclusão de tamanho mostraram que a minoria dos miRNAs circulantes são transportados por exossomas e que a maioria é protegida das RNases endógenas presentes no plasma por um complexo de proteínas, tais como Argonauta (Ago)(ARROYO et al., 2011). Embora esses artigos tenham mostrado que a maioria dos miRNAs circulantes imunoprecipitam com Ago2, outro artigo afirma que os miRNAs circulantes no soro e na saliva estão majoritariamente presentes dentro de microvesículas, principalmente exossomas (GALLO et al., 2012).

Uma vez que miRNAs têm sido mostrados associados a proteínas, tais como a família Argonauta 2 (AGO2) na formação do complexo de silenciamento induzido por RNA, é possível que os miRNAs circulantes também se liguem a algumas proteínas desconhecidas, que por sua vez estabilizam miRNAs em condições adversas, incluindo a digestão por RNase, temperaturas extremas e pH. Pesquisas voltadas na identificação de potenciais proteínas que se ligam aos miRNAs circulantes é um processo contínuo em vários laboratórios, no entanto, a natureza das proteínas ligantes a miRNAs circulantes permanecem não identificadas (ZEN; ZHANG, 2010).

A proteção dos miRNAs circulantes no plasma/soro contra as RNases endógenas também pode ser explicada pela associação destes miRNAs com microvesículas, por exemplo, exossomas. Os exossomas, envolvidos no transporte de miRNA entre as células, são nanovesículas esféricas formadas por uma membrana bi-camada de tamanho entre 50-90 nm (VAN NIEL et al., 2006 217) abundante no plasma e bem conhecidas na participação da mediação do sistema imunitário por meio da apresentação de antígenos (CABY et al., 2005). Elas são secretadas pela membrana endossomal de células hematopoéticas ou não hematopoiéticas (LEE et al., 2010). Estas vesículas são enriquecidas em vários materiais bioativos, incluindo proteínas, lipídios, RNAs, e novas evidências sugerem que exossomas são "communicassomas", isto é, organelas extracelulares que desempenham múltiplos papéis

na comunicação intercelular, incluindo a estimulação direta das células-alvo, tais como complexo de sinalização entre as proteínas de membrana das células receptoras (LEE et al., 2010; VALADI et al., 2007). Foi relatada a presença de ambos mRNAs e miRNAs em exossomas, mais especificamente nos exossomas derivados de mastócitos. Estes RNAs podem ser transferidos de um mastócito para outro, provavelmente através da fusão do exossoma à membrana celular do destinatário. O RNA é funcionalmente entregue e o mRNA pode levar à tradução de novas proteínas em uma célula receptora. O RNA transportado entre as células via exossomas é chamado *exosomal shuttle RNA* (esRNA) (LOTVALL; VALADI, 2007; VALADI et al., 2007).

1.10 Vesículas como comunicadoras intercelulares

As células se comunicam e trocam informações por diferentes mecanismos. Elas podem se comunicar (i) pela secreção de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e pequenos mediadores celulares (nucleotídeos, íons de óxido nítrico, lipídeos bioativos); (ii) pela adesão célula-a-célula que é mediada por um conjunto especializado de moléculas de adesão e (iii) e pela troca de informação utilizando nanotúbulos. Todavia, torna-se foco de pesquisas a comunicação célula a célula envolvendo fragmentos de membrana circulares chamados microvesículas (RATAJCZAK et al., 2006).

As microvesículas estão presentes no plasma sanguíneo na concentração de 5 a 50µg/ml. Estas são secretadas pelo endotélio, por leucócitos, plaquetas e eritrócitos. No soro sanguíneo, a abundância de micropartículas derivadas de plaquetas é de 80%, derivadas do endotélio e leucócitos é de 10%. As microvesículas podem ser originadas de compartimentos da membrana endossomal após a fusão de grânulos secretores com a membrana plasmática onde eles existem como vesículas intraluminais chamadas exossomas (RATAJCZAK et al., 2006).

Estudos recentes revelaram a troca genética entre células utilizando miRNA tanto em microvesículas (até 1 µm) quanto em pequenas vesículas de membrana de origem endocítica chamadas exossomas (50-100 nm) (KOSAKA et al., 2010).

Tabela 2: Partículas em fluidos corporais e suas funções em células receptoras. Adaptado de (KOSAKA et al., 2010).

Partículas	Tamanho típico	Origem da partícula	Funções da partícula nas células receptoras
Microvesículas	0.1 - 1µm	BCLL	Estimula células ósseas estromais da medula a induzir a produção de VEGF
		Células de melanoma	Aumenta a produção de TGF-β1 em macrófagos em cultura Aumenta o potencial de metástase de linhagem de células de melanoma <i>in vivo</i>
Exossomas	10-100nm	Células de glioblastoma	Estimulam a formação de túbulos pelas células endoteliais.
		Células de adenocarcinoma da mama	Induzem potentes células T dependentes CD8+ com efeito antitumor pelas células dendríticas
Prostassoma	50-500nm	Células epiteliais do ducto prostático	Aumentam a capacidade de sobrevivência, motilidade dos espermatozóides e modulam a reatividade acrossomal
		Células da próstata	Protegem as células malignas da próstata de ataque do sistema complemento
Corpos apoptóticos	0.5-2µm	EBV-carregando linhagem de células do linfoma de Burkitt's	Induz a expressão de marcadores específicos de EBV nas células receptoras
		Células endoteliais	induzem a expressão de CXCL12 nas células endoteliais

BCLL, célula B de leucemia linfocítica crônica; CXCL12, quimiocina CXC ligando motivo 12; EBV, vírus de Epstein-Barr; TGF-β1, fator de crescimento de transformação β1; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial.

Exossomas tem sido associadas a diferentes funções celulares e podem ser biomarcadores valiosos para estados de doença. A maioria dos fluidos corporais contém quantidades significativas de exossomas. Não obstante a sua relevância fisiológica, tem sido difícil a sua investigação, pois o mecanismo de biogênese dos exossomas permanece enigmático (PISITKUN; JOHNSTONE; KNEPPER, 2006; ZHOU, H. et al., 2008).

Já foi mostrado que exossomas derivados de linhagens de mastócito MC/9, medula óssea derivada de mastócito e a linhagem celular de mastócito HMC-1 contêm grande quantidade de RNA, ao passo que nenhum DNA foi encontrado. Utilizando microarranjos e análise por chip de microRNA, foram identificados 1.300 mRNAs e 120 microRNAs nestes exossomas derivados de mastócito, estes RNAs parecem ser específicos dos exossomas, já que não foram detectados nas células doadoras. Além disso, foi demonstrado em experimentos *in vitro* que o mRNA transportado por exossomas de mastócito de

camundongos são funcionalmente entregues, pois, quando adicionados a células de mastócitos humanos levam a produção de proteínas de camundongos nas células humanas (LOTVALL; VALADI, 2007) (VALADI et al., 2007).

Com o aumento dos estudos sobre exossomas, foi necessário a criação de um banco de dados capaz de aproveitar todo potencial dos dados gerados referentes à estudos sobre o conteúdo dos exossomas, assim como armazenar os dados disponíveis. Esse banco de dados de exossomas é chamado de "ExoCarta", que cataloga os componentes exosomais, tais como proteínas, mRNA, miRNA e lipídeos . O ExoCarta é um web site (<http://www.exocarta.org>) de exossomas que atualiza as moléculas identificadas nos exossomas nos últimos anos (MATHIVANAN et al., 2012; MATHIVANAN; SIMPSON, 2009; SIMPSON et al., 2009).

Apesar da importância de determinar as associações dos miRNAs circulantes para elucidar os mecanismos de ação destas moléculas, poucos esforços têm sido feitos nesse sentido.

2 Objetivos

2.1 Geral

Quantificar os miRNAs miR-16, -let7a, -1, 133a e -206 circulantes nas frações plasmáticas sobrenadante e vesicular de 10 atletas recreacionais antes e após corrida de meia maratona;

Avaliar em amostras de plasma de corredores antes e após corrida de meia maratona a associação à fração proteica ou vesicular para os miRNAs músculo específicos, miR-1, miR-133a e miR-206 após tratamento com Proteinase K.

2.2 Específicos

Purificar frações plasmáticas associadas à complexos proteicos e vesículas;

Validar a identificação de miRNAs circulantes associados a fração proteica (miR-16) e a fração vesicular (let7a) pelo tratamento com Proteinase K.

3 Justificativa

A avaliação de miRNAs circulantes é atualmente alvo de um grande número de estudos tanto na busca de biomarcadores para doenças como no entendimento destas moléculas na fisiologia. No entanto, o papel da atividade física via exercícios estruturados é desconhecido. Potencialmente miRNAs circulantes regulados pela atividade física podem representar uma das várias vias pelas quais o músculo esquelético, endotélio, músculo cardíaco e outros tecidos enviam mensagens locais e sistêmicas em resposta ao exercício. Nosso grupo iniciou trabalhos buscando identificar a presença de miRNAs músculos específicos em resposta ao exercício. Os dados produzidos no contexto da tese de doutorado da estudante Clarissa Pedrosa Gomes mostra que tanto o miR-1, miR-133a e o miR-206 aparecem aumentados no plasma após corrida de 21km (meia maratona) em relação ao momento imediatamente antes da prova.

Atualmente está claro na literatura científica que os miRNAs circulantes estão protegidos da ação de RNAses por associação a proteínas, lipoproteínas ou a microvesículas. Aqueles miRNAs associados a lipoproteínas e a microvesículas podem potencialmente ser transferidos horizontalmente o que implica em um fenômeno de comunicação parácrina. Para os miRNAs músculos específicos estudados em nosso grupo não se sabe como eles estão presentes no plasma. Assim estabelecer esta associação é importante para conhecimento do fenômeno em si, como também tem implicações para o potencial papel destes miRNAs na comunicação parácrina no exercício físico. É totalmente desconhecido se o exercício tem algum papel ativo na liberação destas microvesículas.

4 Hipóteses

O exercício físico de endurance é capaz de alterar a quantidade dos miRNAs miR-16, -let7a, -1, 133a e -206 circulantes nas frações plasmáticas sobrenadante e vesicular de atletas recreacionais antes e após a meia maratona.

Os miRNAs músculo específicos, myomiRs, miR-1, -133a e -206 circulantes no plasma são estáveis após tratamento com proteinase K o que indica que estes miRNAs são transportados por microvesículas.

5 Material e Métodos

5.1 Amostras

Amostras de sangue humano de 10 atletas recreacionais, 8 homens e 2 mulheres, todos saudáveis, foram coletados por punção venosa utilizando tubos revestidos com EDTA. Todos os indivíduos foram selecionados com base em seu envolvimento em treinamento estruturado para corridas de 10 km e meia maratona durante os últimos dois anos. Todos os voluntários foram amostrados antes de começar e imediatamente após terem terminado a meia maratona de Brasília (21km) que aconteceu em 10 Abril de 2011. Todos eles terminaram a corrida entre 1 hora e 34 minutos a 2 horas e 24 minutos. Eles preencheram o termo de livre consentimento informado, de acordo com aprovação ética do comitê local. O sangue foi processado para a separação do plasma dentro de 3h após a coleta. A fração de plasma sanguíneo foi obtida após centrifugação a 1400 x g durante 10 min e armazenada a -20 ° C, em seguida, 300 µl de plasma de cada indivíduo foram usados para a preparação do pool de amostras.

Tabela 3. Caracterização dos atletas recreacionais. IMC: índice de massa corporal.

Atletas	Idade	Peso (Kg)	Estatura (cm)	IMC (kg/m ²)	Tempo oficial	treino (meses)	Realiza treino periodizado	Volume semanal de treino (Km)
Atleta 1 (masc)	28	81	1,79	25,28	01:34:15	180	não	50
Atleta 2 (masc)	32	83	1,8	25,62	01:51:09	3	sim	30
Atleta 3 (masc)	28	113	1,93	30,34	01:57:41	108	sim	40
Atleta 4 (fem)	46	55	1,6	21,48	02:11:49	36	sim	30
Atleta 5 (masc)	39	82	1,71	28,04	01:42:29	5	sim	65
Atleta 6 (fem)	42	57	1,58	22,83	02:24:03	28	sim	45
Atleta 7 (masc)	40	78	1,71	26,67	01:46:49	24	sim	50
Atleta 8 (masc)	30	80	1,72	27,04	01:52:28	168	sim	30
Atleta 9 (masc)	49	75	1,78	23,67	01:36:12	24	sim	100
Atleta 10 (masc)	29	94	1,81	28,69	01:56:34	216	sim	27,5
Média	35,73	78,18	1,73	25,7		81,82		52,05
dp	7,71	16,64	0,1	2,76		77,61		27,45
máximo	49	113	1,93	30,34		216		105
mínimo	28	55	1,58	21,48		3		27,5

5.2 Fracionamento do Plasma

As amostras previamente divididas em dois grupos (antes e após a corrida) foram separadas nas frações plasmáticas que serão chamadas ao longo do trabalho de sobrenadante e vesicular. Para a obtenção destas frações plasmáticas foram feitas uma série de centrifugações do plasma, começando por 500 x g durante 10 min para eliminar resíduos celulares e 16.500 x g durante 20 min. Depois, 300µL de plasma de cada indivíduo foram utilizados no pool de amostras. Em seguida, 3mL do pool de plasma foram diluídos em tampão PBS 1X até um volume final de 12 mL e ultracentrifugados a 80.000 x g durante 120 min (Beckman SW-40 ti), em seguida, a fração sobrenadante foi obtida por decantação e a fração vesicular foi obtida após ressuspender o precipitado do tubo em 2 ml de tampão PBS 1X. Ao final do fracionamento plasmático foram obtidos quatro grupos de amostras: fração sobrenadante antes da corrida (SA), fração sobrenadante após a corrida (SD), fração vesicular antes da

corrida (VA) e fração vesicular depois da corrida (VD). As amostras foram armazenadas a -20 °C para posterior análise.

5.3 Tratamento com Proteinase K

As amostras foram novamente divididas em 2 grupos, o primeiro grupo sofreria o tratamento com proteinase K enquanto o segundo não. Um grupo de amostras foi incubado em Proteinase K (Qiagen) 0,65 mg/ml a 56°C durante 1h para investigar quais miRNAs sofriam redução na quantificação após o tratamento com Proteinase K nas frações sobrenadante e vesicular. Depois disto, os oito grupos de amostras: sobrenadante antes da corrida tratada com proteinase K (SAPK), sobrenadante antes da corrida não tratada (SA), sobrenadante após a corrida tratada com proteinase K (SDPK), sobrenadante depois da corrida não tratada (SD), vesicular antes da corrida tratada com proteinase K (VAPK), vesicular antes não tratada com proteinase K (VA), vesicular depois da corrida tratada com proteinase K (VDPK), vesicular depois da corrida não tratada (VD). Todas as amostras foram levadas à extração de pequenos RNAs.

5.4 Extração de RNA

A extração de RNA total, incluindo miRNA, foi feita utilizando 300µL das respectivas frações plasmáticas (SA), (SAPK), (SD), (SDPK), (VA), (VAPK), (VD), (VDPK) seguindo o protocolo do kit comercial miRNeasy Mini Kit (Qiagen, USA). Resumidamente, 300µL de plasma de cada fração foram misturados em 1,5mL de Qiazol, vortexados por 10 seg e incubados em temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, foram adicionados 20 fmol de cada oligonucleotídeo sintético de RNA de *Caenorhabditis elegans* (sintetizados pela Sigma, USA) (tabela 4) de cel-miR-39, -54 e -238 para realizar a posterior normalização da variação das amostras, de acordo com o descrito por Mitchell, 2008 (MITCHELL, P.S. et al., 2008). Em cada amostra foram adicionados 0,2 volumes de clorofórmio e levadas ao shaker por 15 seg, após descansar por 2 a 3 min foram vortexadas. As amostras foram centrifugadas por 15 min a 12.000 x g a 4°C para separação de RNA, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de coleta (fornecido pelo kit), foi adicionado 1,5 volume de etanol 100%, misturado por pipetagem várias vezes e imediatamente 700 µL da solução foram pipetadas dentro da coluna *mini spin RNeasy*. A coluna foi centrifugada a 8.000 x g por 15 seg em temperatura ambiente e o líquido que passou pela coluna foi descartado. Este último passo foi feito até que toda a

amostra tenha passado pela coluna. Em seguida, foram adicionados 700 μL do tampão RWT na coluna, e esta foi centrifugada por 15 seg a 8.000 $\times g$ para sua lavagem e o líquido que passou pela coluna foi descartado. No próximo passo, 500 μL de tampão RPE foi inserido na coluna e centrifugada por 15 seg a 8.000 $\times g$ e o líquido descartado. Foi adicionado novamente 500 μL de tampão RPE na coluna e esta centrifugada por 2 min a 8.000 $\times g$ e o líquido descartado. Para secagem da coluna foi repetida a centrifugação por 1 min. Para eluir o RNA, a coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL (fornecido pelo kit), pipetados 50 μL de água livre de RNAses diretamente na coluna e para eluir o RNA a coluna foi centrifugada por 1 min a 8.000 $\times g$. O isolamento do RNA procedeu de acordo com as instruções do fabricante e o RNA foi eluído com 100 μL de água livre de RNAses.

A quantificação do RNA total extraído das diferentes frações do plasma foi feita utilizando os métodos de espectrofotometria e fluorimetria, nos aparelhos NanoDrop® e Qubit®. Devido a baixa quantidade de miRNA circulantes no plasma, não foi possível quantificar o RNA extraído em todas as frações, aparecendo a mensagem *below the limit of detection*. Para normalizar a quantidade de RNA a ser utilizada para fazer a transcrição reversa, foi utilizado o mesmo volume de cada extração, 5 μL , como vem sendo feito em recentes publicações (D'ALESSANDRA et al., 2010; MIZUNO et al., 2011).

5.5 Ensaio de miRNA RT-qPCR

A reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR) foi feita utilizando sondas de hidrólise específicas para cada miRNA alvo (Tabela 5). A mesma quantidade de 5 μL de RNA foi usada para todas as reações de transcrição reversa utilizando os kits comerciais chamados *TaqMan miRNA Reverse Transcription* e *miRNA-specific stem-loop primers of TaqMan miRNA assay* (Applied Biosystems, USA). Resumidamente, 5 μL de RNA foram adicionados a uma mistura 7 μL (composto de 100 mM de dNTPs, MultiScribe transcriptase reversa, tampão de transcrição reversa 10X, RNase inibidor e Nuclease livre de água) e, em seguida, 3 μL de iniciadores foi adicionado. A reação foi feita em um termociclador Veriti Cyclor (Applied Biosystems) com as temperaturas de 16°C durante 30 min, 42°C durante 30 min e 85°C durante 5 min. O cDNA obtido foi armazenado em -20°C. O PCR quantitativo foi feito em triplicata em uma reação contendo 1,5 μL de cDNA, 8 μL de reagentes para a reação de PCR (composto de 5 μL *TaqMan Universal PCR Master Mix 2X* sem Amperase, e 3 μL de água livre de nuclease; Applied Biosystems) e 0,5 μL de sonda de hidrólise (TaqMan iniciador miRNA-específica)

para um volume final de 10 μ L. A PCR quantitativa (qPCR) foi realizada em placas de 96 poços e no termociclador *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) a 95°C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 seg e 60°C durante 1 min.

Tabela 4: Descrição dos oligonucleotídeos de RNA adquiridos para a normalização dos dados de RT-qPCR.

miRNA	Tamanho (nt)	Sequência do oligo (5' para 3')
cel-miR-39	22	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG
cel-miR-54	24	UACCCGUAUAUCUUCAUAAUCCGAG
cel-miR-238	23	UUUGUACUCCGAUGCCAUUCAGA

Tabela 5. Ensaios de miRNA TaqMan adquiridos da Applied Biosystems (AB) utilizados como alvo nos experimentos.

miRNA	AB Assay ID	Sequências dos miRNAs maduros (5' para 3')
hsa-let7a	000377	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
hsa-miR-16	000391	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
hsa-miR-1	002222	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU
hsa-miR-133a	002246	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG
hsa-miR-206	000510	UGGAAUGUAAAGGAAGUGUGUGG
hsa-cel-miR-39	000200	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG
hsa-cel-miR-54	001361	UACCCGUAUAUCUUCAUAAUCCGAG
hsa-cel-miR-238	000248	UUUGUACUCCGAUGCCAUUCAGA

5.6 Análise dos dados de RT-qPCR

A curva de eficiência dos iniciadores de hidrólise de cada miRNA alvo foi confirmada por meio de uma série de diluição contendo entre 4 e 6 pontos feitas em um conjunto de amostras de RNA. Após a obtenção das inclinações das curvas de eficiência de cada iniciador, a eficiência da reação foi calculada no Excel utilizando a seguinte fórmula: $E = (10^{(-1/\text{slope}) - 1}) \times 100$ onde E = eficiência, slope = inclinação da curva. Os valores da eficiência da reação devem estar entre 90% e 110%.

Para a quantificação relativa, as alterações na expressão do gene da amostra são medidos com base em qualquer gene de controle endógeno ou uma amostra de referência, também conhecido como um calibrador. O método Ct comparativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) é um modelo matemático que calcula as alterações na expressão de genes como diferenças relativas (*fold change*) entre uma amostra experimental e calibrador. Este método requer um gene de controle para calcular o ΔC_t (Ct do gene alvo menos Ct do gene controle). Em seguida, $\Delta\Delta C_t$

é obtido entre duas amostras. Porque o método Ct comparativo não requer uma curva padrão, é útil quando se examina um grande número de amostras desde todos os poços de reação são preenchidos com reações de exemplo, em vez de padrões.

5.7 Cálculo da quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

O fracionamento do plasma nas amostras SA, SD; VA, VD mostram os valores relativos de expressão dos miRNA estudados (após a corrida menos antes da corrida) através da quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ nas respectivas frações. A Normalização dos dados foi feita como descrito por Mitchell et al. (2008), onde a a calibração dos dados utiliza genes de referência análogos em humanos de três miRNA de *C.elegans* (cel-miR-39, -54, -238). Pelo fato de serem análogos em humanos, a quantificação destes miRNAs no plasma deve-se apenas à quantidade inserida durante a extração. Este método é o mais aceito de quantificação relativa em amostras de plasma, já que não foram descritos genes de referência endógenos de miRNA neste tecido. A quantificação relativa é usada quando se deseja comparar níveis de expressão ou mudanças na expressão gênica. Os valores das amostras antes da corrida em todas as frações foram determinados arbitrariamente como 1 (expressão normal) para facilitar o entendimento, sendo os valores SD e VD calculados em relação ao valor antes da corrida, e o valor de quantificação relativa representa quantas vezes aumentou ou diminuiu a quantificação do miRNA após a corrida nas frações plasmáticas.

A placa de 96 poços utilizada nas reações de qPCR foi desenhada de forma a agrupar todas as amostras de um mesmo miRNA e assim evitar erros de variação na quantificação entre placas (figura 5).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	miR54 SA Ct: 16,28	miR54 SA Ct: 15,08	miR54 SA Ct: 15,31	miR54 SAPK Ct: 17,63	miR54 SAPK Ct: 17,57	miR54 SAPK Ct: 17,6	miR206 SA Ct: 33,71	miR206 SA Ct: 36,97	miR206 SA Ct: 34,83	miR206 SAPK Ct: 35,8	miR206 SAPK Ct: 35,92	miR206 SAPK Ct: 36,33
B	miR54 SD Ct: 17,14	miR54 SD Ct: 16,96	miR54 SD Ct: 17,02	miR54 SDPK Ct: 18,45	miR54 SDPK Ct: 18,33	miR54 SDPK Ct: 18,34	miR206 SD Ct: 35,58	miR206 SD Ct: 35,37	miR206 SD Ct: 35,58	miR206 SDPK Ct: 36,63	miR206 SDPK Ct: 36,78	miR206 SDPK Ct: 36,57
C	miR54 PA Ct: 12,4	miR54 PA Ct: 12,16	miR54 PA Ct: 12,21	miR54 PAPK Ct: 15,78	miR54 PAPK Ct: 15,71	miR54 PAPK Ct: 15,77	miR206 PA Ct: 37,2	miR206 PA Ct: 33,65	miR206 PA Ct: 35,57	miR206 PAPK Ct: Undeterm...	miR206 PAPK Ct: 36,65	miR206 PAPK Ct: 36,95
D	miR54 PD Ct: 15,26	miR54 PD Ct: 15,39	miR54 PD Ct: 15,88	miR54 PDPK Ct: 15,38	miR54 PDPK Ct: 15,44	miR54 PDPK Ct: 15,04	miR206 PD Ct: 35,92	miR206 PD Ct: 35,79	miR206 PD Ct: 35,08	miR206 PDPK Ct: Undeterm...	miR206 PDPK Ct: 36,99	miR206 PDPK Ct: 36,57
E	miR238 SA Ct: 14,79	miR238 SA Ct: 14,82	miR238 SA Ct: 15,01	miR238 SAPK Ct: 17,49	miR238 SAPK Ct: 17,53	miR238 SAPK Ct: 17,5	miR54 SA Ct: 28,38					
F	miR238 SD Ct: 16,75	miR238 SD Ct: 16,73	miR238 SD Ct: 16,97	miR238 SDPK Ct: 17,88	miR238 SDPK Ct: 17,85	miR238 SDPK Ct: 17,96	miR238 SA Ct: Undeterm...					
G	miR238 PA Ct: 11,54	miR238 PA Ct: 11,71	miR238 PA Ct: 11,61	miR238 PAPK Ct: 15,28	miR238 PAPK Ct: 15,31	miR238 PAPK Ct: 15,49	miR206 SA Ct: Undeterm...					
H	miR238 PD Ct: 15,97	miR238 PD Ct: 15,47	miR238 PD Ct: 15,83	miR238 PDPK Ct: 14,55	miR238 PDPK Ct: 14,54	miR238 PDPK Ct: 14,72						

Figura 5: Representação de uma placa de 96 poços utilizada na quantificação do miR-206 em amostras tratadas e não tratadas com Proteinase K.

Os cálculos de quantificação relativa, foram feitos no Excel, como mostram as tabelas 6 e 7, exemplificando a análise feita para o miR-133a após tratamento com proteinase K. A primeira etapa é a normalização das médias dos Cts, que foi feita como descrito por (KROH et al., 2010). Resumidamente, foi calculada a mediana de todas as médias dos genes de referência de *C. elegans*, considerando todas as amostras (tabela 6). Em seguida, o fator de normalização foi calculado pela subtração da média dos Ct de miRNA sintético de *C. elegans* da amostra de interesse pelo valor da mediana obtido no passo anterior (tabela 7, Ct normalizado). O fator de normalização foi adicionado ao valor da média do Ct obtido de cada amostra e foi chamado de Ct normalizado (tabela 7). O delta Ct (ΔCt) foi calculado subtraindo o valor do Ct normalizado pelo valor da mediana dos genes de referência e o delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) foi calculado pela subtração de dois deltas Ct que se querem analisar, por exemplo, delta Ct da amostra sobrenadante antes tratada com Proteinase K (SAPK) menos o valor de delta Ct da amostra sobrenadante antes não tratada com Proteinase K (SA), neste passo a interpretação é dada de acordo com a ordem de subtração das amostras. No caso de SAPK menos SA o resultado será quantas vezes aumentou ou diminuiu o miRNA após o tratamento com Proteinase K. Depois de obtido o delta delta Ct, foi calculada a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se o valor do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ for maior que zero, deve-se colocar o valor na fórmula: $-1/2^{-\Delta\Delta Ct}$, finalmente, este foi o valor final de quantificação relativa encontrado nas amostras (tabela 7).

Tabela 6: Cálculos dos genes de referência de *C. elegans* utilizado para normalizar as amostras do miR-133a tratadas com Proteinase K.

Normalizadores		Média	Média em ordem crescente	Mediana da média
39	SAPK	16,55	17,37	15,77
54		18,29		17,13
238		17,26		17,22
39	SDPK	16,16	17,22	17,37
54		18,54		
238		16,94		
39	PAPK	15,07	15,77	
54		16,81		
238		15,41		
39	PDPK	14,79	17,13	
54		16,99		
238		19,6		

Para os cálculos da quantificação dos miRNAs nas frações plasmáticas antes e depois da corrida, os valores utilizados para o cálculo do delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) foram: Sobrenadante depois menos sobrenadante antes (SD-SA) e vesicular depois menos vesicular antes (VD-VA). Já para tentar entender indiretamente se os miRNAs circulantes no plasma estão associados à proteínas ou microvesículas, os valores utilizados para o cálculo do delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) foram as respostas que os miRNAs apresentaram após o tratamento com Proteinase K, as amostras utilizadas foram: Sobrenadante antes tratado com proteinase K menos sobrenadante antes não tratado (SAPK-SA); Sobrenadante depois tratado com proteinase K menos sobrenadante depois não tratado (SDPK-SD); Vesicular antes tratado com proteinase K menos vesicular antes não tratado (VAPK-VA); Vesicular depois tratado com proteinase K menos vesicular depois não tratado (VDPK-VD).

Tabela 7: Cálculo utilizado na quantificação relativa do miR-133a nas frações plasmáticas do sobrenadante e vesicular antes e após tratamento com Proteinase K.

Poço	Nome da amostra	Nome do alvo	Cr	Média do Ct	Ct normalizado	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Quantificação relativa
E4	SAPK	133	35,82	35,50	35,30	18,13	0,14	0,91	-1,10
E5	SAPK	133	34,95				SAPK -SA		
E6	SAPK	133	35,72				5,46	0,02	-44,16
F4	SDPK	133	34,56	35,49	35,45	18,28			
F5	SDPK	133	36,25				SDPK -SD		
F6	SDPK	133	35,66				4,11	0,06	-17,29
G4	PAPK	133	32,27	32,24	33,64	16,47	1,61	0,33	-3,05
G5	PAPK	133	31,89				PAPK -PA		
G6	PAPK	133	32,56				0,31	0,80	-1,24
H4	PDPK	133	34,69	35,21	35,25	18,08			
H5	PDPK	133	34,97				PDPK -PD		
H6	PDPK	133	35,96				1,01	0,50	-2,01

Ct normalizado = Média do Ct – (média dos normalizadores para o alvo – mediana da média de todos os normalizadores);

ΔCt = Ct normalizado do alvo – média dos normalizadores para o alvo;

$\Delta\Delta Ct$ = ΔCt da amostra tratada com Proteinase K – ΔCt da amostra não tratada com Proteinase K;

Quantificação relativa = $-1/2^{-\Delta\Delta Ct}$

6 Resultados

6.1 Curvas de eficiência dos miRNA estudados

As curvas de eficiência dos iniciadores utilizados neste trabalho foram feitas a partir de RNA extraído de amostra de músculo de camundongos, pois as amostras de RNA extraídas de plasma humano apresentam pouca quantidade de RNA, o que torna muito difícil conseguir o número mínimo de pontos de diluição para uma boa curva de eficiência. Lembrando que o RNA mensageiro é instável no plasma e rapidamente degradados pela atividade das RNAses endógenas, logo, o RNA presente em amostras de plasma humano estão associados a proteínas ou vesículas lipídicas para se protegerem das RNAses.

A curva de eficiência do cel-miR-39 apresentou inclinação de -3,50 tendo como eficiência 92,75%, dentro do limite aceitável entre 90 e 110%. Para o cel-miR-54, a curva de eficiência foi feita utilizando 5 pontos de diluição seriada e a inclinação da curva foi de -3,22 e a eficiência de 104,41%. A curva do cel-miR-238 foi feita utilizando 5 pontos de diluição seriada e a inclinação da curva foi de -3,53 e a eficiência encontrada foi de 91,77%. Para o miR-16 a curva apresentou inclinação de -3,53 e eficiência de 91,82%. Para o miR-let7a, a curva mostrou inclinação de -3,44 e eficiência de 95,05%.

A curva de eficiência do primeiro miRNA músculo específico (myomiR), miR-1, apresentou inclinação de -3,37 e eficiência de 97,73%. O segundo myomiR analisado, miR-133a, mostrou inclinação de -3,31 e eficiência de 100,39%. Para o último myomiR analisado, miR-206, o inclinação da curva foi de -3,26 e a eficiência da reação de 102,54%, a curva de eficiência deste miRNA foi feita com apenas 4 pontos de diluição, número mínimo de diluições de acordo com as normas publicadas no *MIQE: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* (BUSTIN et al., 2009).

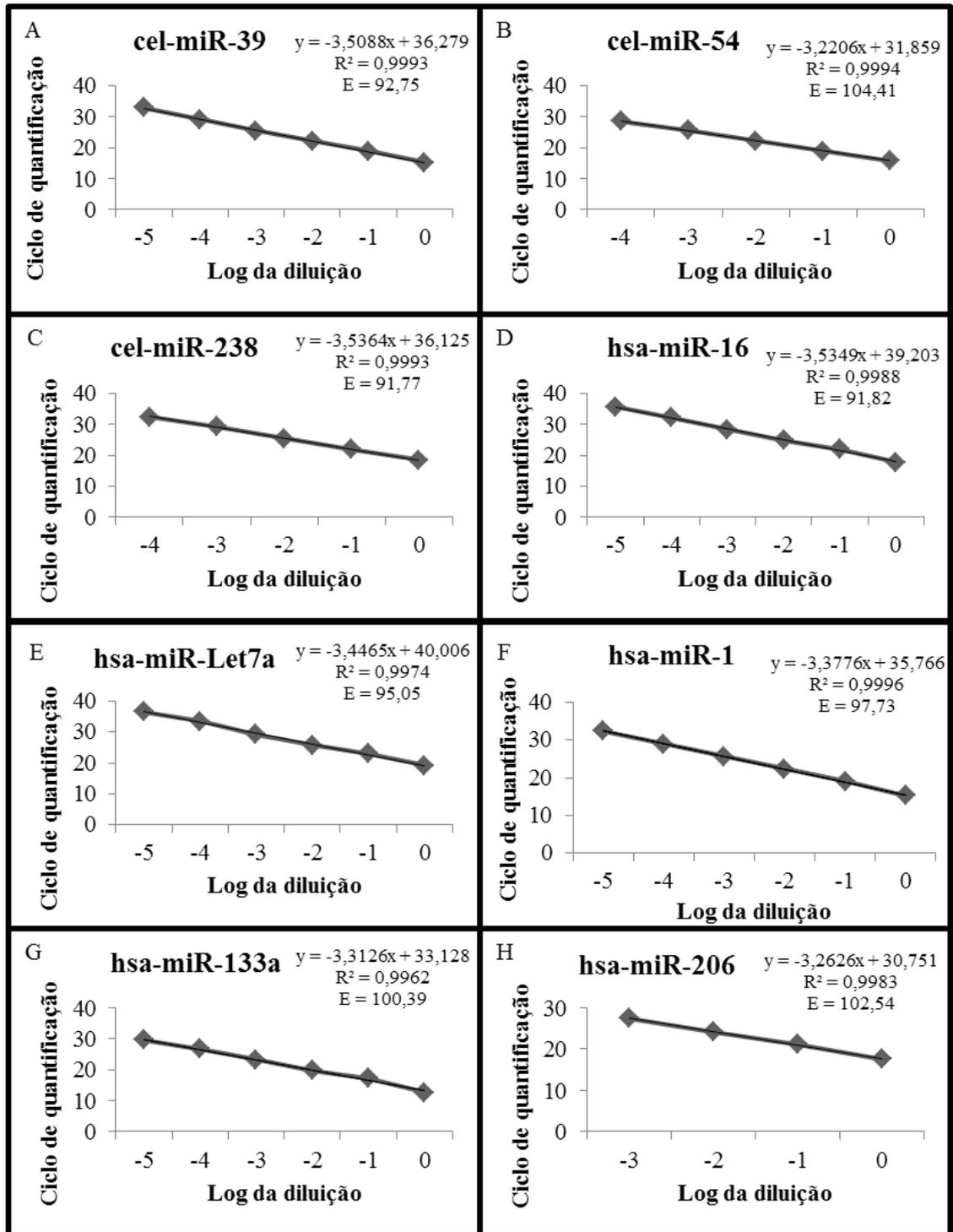


Figura 5. Curvas de eficiência de todos os miRNAs estudados. (A), (B) e (C) mostram as curvas de eficiência dos miRNAs utilizados como genes de referência, análogos em humanos e expressos em *Caenorhabditis elegans*, são eles: cel-miR-39, -54, -238. (D) e (E) mostram as curvas de eficiência de dois oncomiRs, miR-16 e miR-let7a. (F), (G) e (H) mostram as curvas de eficiência dos miRNAs músculo específicos miR-1, -133a, -206. E = eficiência.

6.2 Quantificação relativa dos oncomiRs miR-16 e Let7a nas frações plasmáticas após a corrida

A quantificação relativa do miR-16 mostrou que ele permaneceu inalterado na fração plasmática do sobrenadante após a corrida, e que na fração vesicular depois da corrida, o miR-16 apresentou uma diminuição de -1,11 vez (figura 6A).

O oncomiR let7a mostrou aumento na quantidade após a corrida, tanto na fração sobrenadante, de aproximadamente 1,5 vez, quanto na fração vesicular, de aproximadamente 2 vezes (figura 6B).

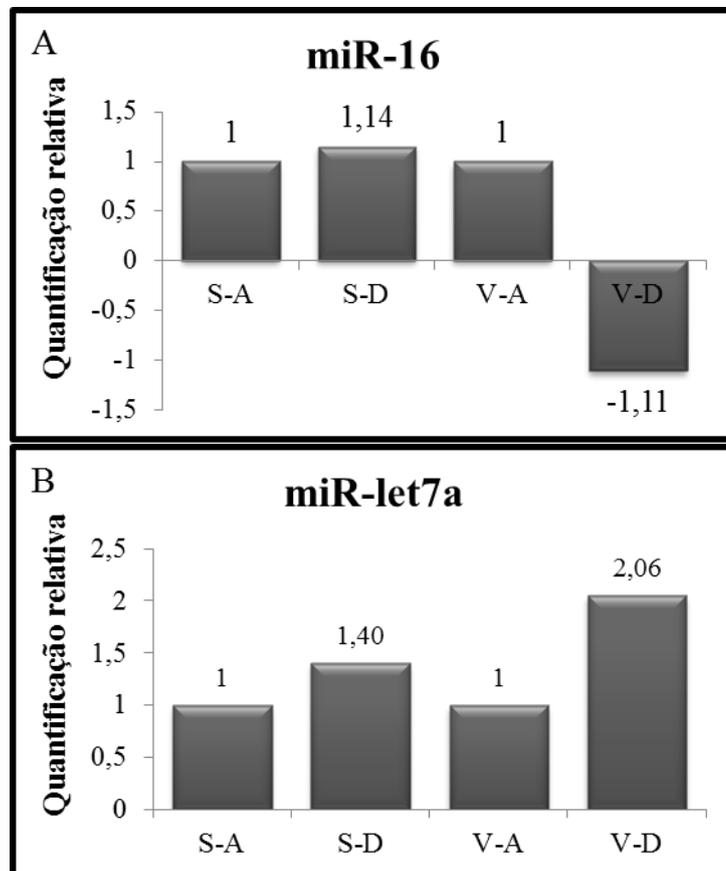


Figura 6: Quantificação relativa do miR-16 (A) e miR-let7a (B) antes e após corrida de meia maratona nas frações plasmáticas de um pool de 10 atletas recreacionais. S-A = sobrenadante antes; S-D = sobrenadante depois; V-A = vesicular antes; V-D = vesicular depois.

6.3 Quantificação relativa dos miRNAs músculo específico miR-1, -133a e -206 nas frações plasmáticas após a corrida

Entre os miRNAs músculo específicos, myomiRs, o miR-1 apresentou diminuição na quantificação relativa após a corrida tanto na fração sobrenadante (aproximadamente -2,3 vezes), quanto na fração vesicular, aproximadamente -1,4 vez (figura 7A). Da mesma forma, o myomiR 133a apresentou diminuição na quantidade encontrada próxima a do miR-1, com redução na fração do sobrenadante após a corrida de -2,82 vezes e redução na fração vesicular após a corrida de -1,88 vez (figura 7B). Tanto o miR-1 quanto o miR-133a tiveram a expressão reduzida após o exercício físico nas duas frações plasmáticas. Já o miR-206 apresentou um padrão de quantificação diferente dos demais miRNAs. A quantificação relativa na fração sobrenadante depois da corrida mostrou um aumento de 8,47 vezes, e na fração vesicular depois da corrida o aumento foi de aproximadamente 150x (figura 7C).

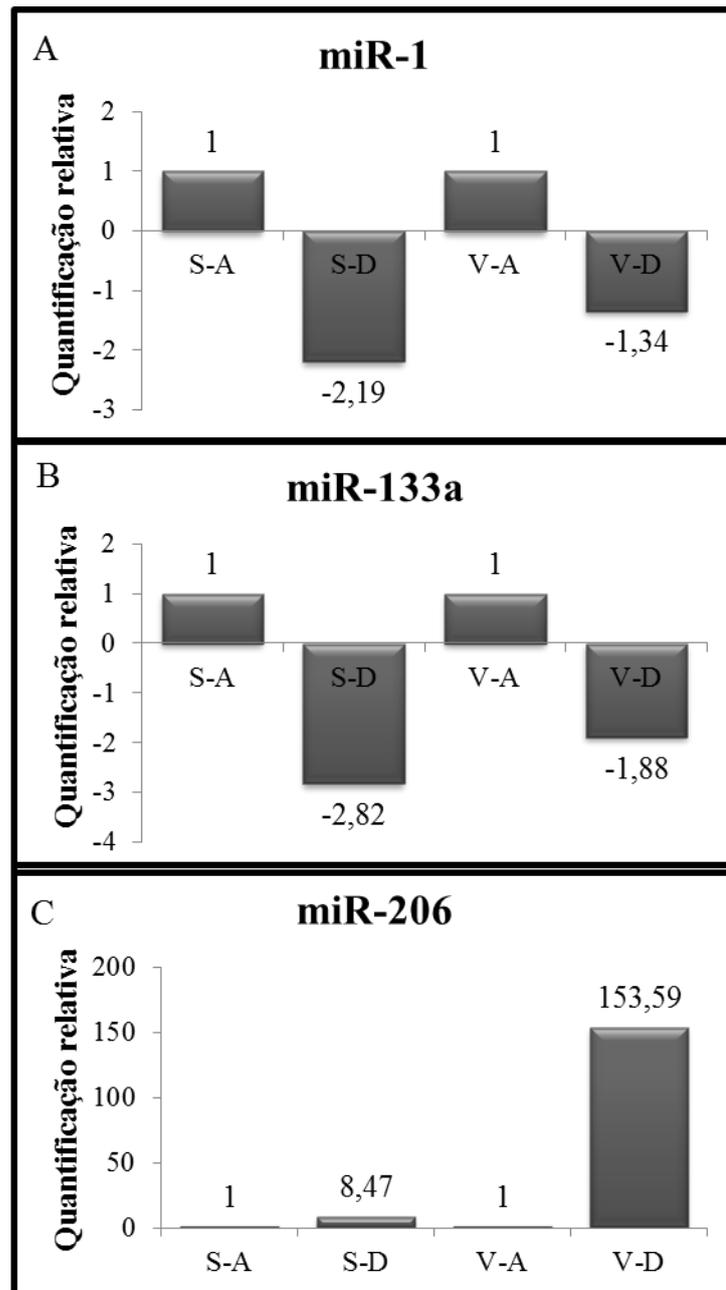


Figura 7: Quantificação relativa dos miRNAs músculo específicos miR-1, -133a, -206 nas frações plasmáticas antes e após corrida de meia maratona em um pool de 10 atletas recreacionais. (A) Quantificação relativa do miR-1 antes e após a corrida nas frações sobrenadante e vesicular do plasma. (B) Quantificação relativa do miR-133a antes e após a corrida nas frações plasmáticas. (C) Quantificação relativa do miR-206 antes e após a corrida nas frações plasmáticas. S-A = sobrenadante antes; S-D = sobrenadante depois; V-A = vesicular antes; V-D = vesicular depois.

6.4 Quantificação relativa dos OncomiRs miR-16 e Let7a após tratamento com Proteínase K

Os dois oncomiRs utilizados neste trabalho (miR16, Let7a) foram escolhidos como controle para o tratamento com Proteínase K, já que (ARROYO et al., 2011) classificou miR-16 associado à proteínas, sendo liberado da associação com proteínas pelo tratamento com Proteínase K e rapidamente degradado pelas RNAses endógenas. Já a quantificação relativa do miR-let7a permaneceu estável após o tratamento com Proteínase K, sugerindo que este miRNA circula no plasma/soro associado à vesículas lipídicas. Para investigar isto, Arroyo, 2011 (ARROYO et al., 2011 18) utilizando centrifugação diferencial, cromatografia por exclusão de tamanho e tratamento com proteínase K mostrou que o miR-16 se encontra associado à proteínas, enquanto o miR-let7a se encontra associado à vesículas. De acordo com os dados encontrados, o miR-16 após tratamento de adição de proteínase K reduziu a quantificação relativa em aproximadamente -18 e -20 vezes para a fração sobrenadante do plasma, antes e após o exercício físico (figura 8A e 8B), respectivamente, enquanto que a redução na fração vesicular na quantidade de miRNA circulando de miR16 foi de aproximadamente -2,5 antes e de -2,17 vezes depois da corrida. (Figura 8C e 8D).

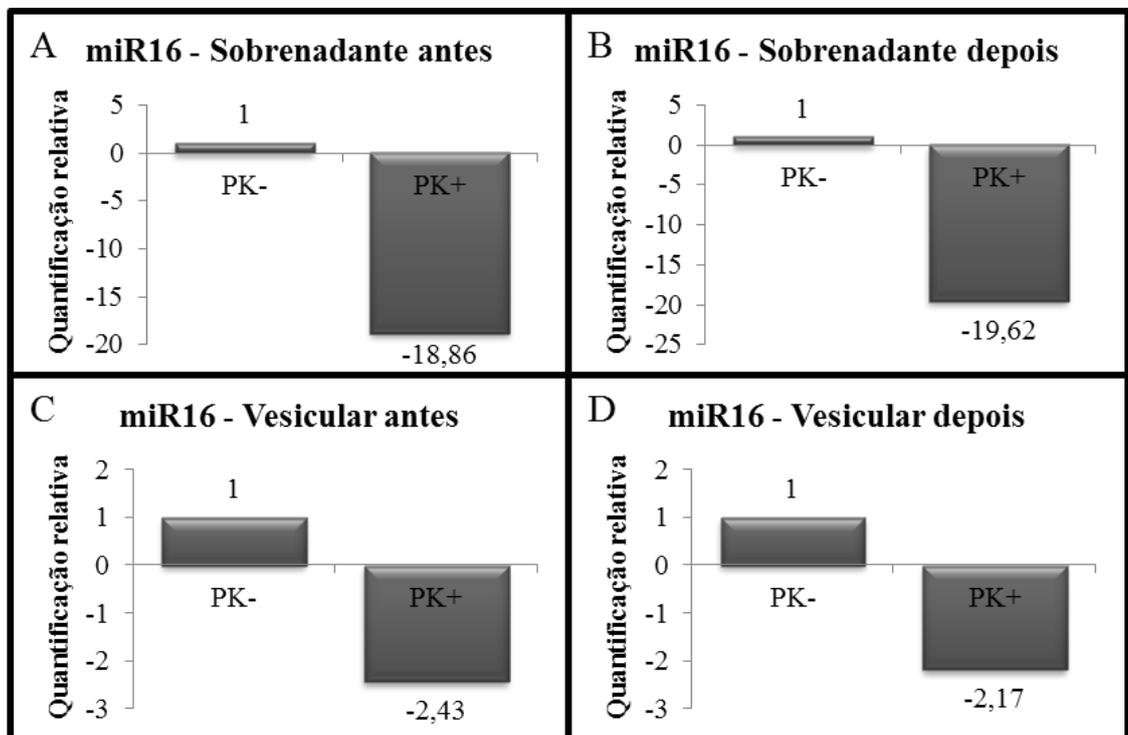


Figura 8: Quantificação relativa do miR-16 em quatro frações plasmáticas tratadas e não tratadas com Proteínase K. (A) Quantificação relativa na fração sobrenadante antes da

corrida (S-A) não tratada (PK-) e tratada (PK+) com Proteinase K. (B) Quantificação relativa na fração sobrenadante depois da corrida (S-D) não tratada (PK-) e tratada com Proteinase K (PK+). (C) Quantificação relativa do miR-16 na fração vesicular antes (V-A) não tratada (PK-) e tratada (PK+) com Proteinase K. (D) Quantificação relativa do miR-16 e na fração vesicular depois (V-D) não tratada (PK-) e tratada (PK+) com Proteinase K.

O padrão que se deve esperar da quantificação relativa dos miRNAs associados à microvesículas após o tratamento com proteinase K é uma leve diminuição na quantificação de miRNA circulando na fração do sobrenadante, como foi mostrando na figura 9 que mostra uma pequena redução no nível de expressão de miR-let7a na fração após o tratamento de proteinase K em comparação com miR16. De acordo com a figura 9A e 9B, o miR-let7a após tratamento com proteinase K reduziu a quantificação relativa em -1,22 vez na fração sobrenadante antes da corrida e aumentou em 2,63 vezes na fração sobrenadante depois da corrida. Já na fração vesicular antes da corrida o tratamento com proteinase K levou à diminuição na quantificação do miR-let7a em -1,27 vez e na fração vesicular após o tratamento com Proteinase K a quantificação relativa do miR-let7a aumentou em 8,33 vezes. (Figura 9C e 9D).

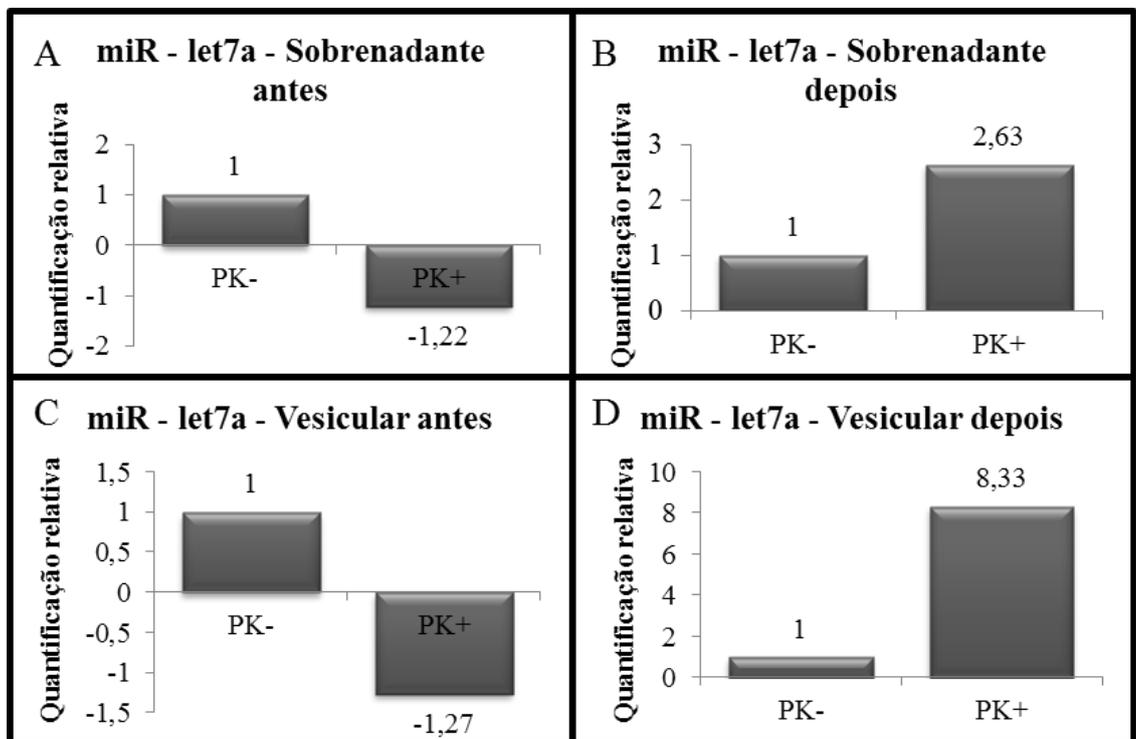


Figura 9: Quantificação relativa do miR-let7a em quatro frações plasmáticas tratadas e não tratadas com Proteinase K. (A) Quantificação relativa na fração sobrenadante antes da

corrida (S-A) não tratada (PK-) e tratada (PK+) com Proteinase K. (B) Quantificação relativa na fração sobrenadante depois da corrida (S-D) não tratada (PK-) e tratada com Proteinase K (PK+). (C) Quantificação relativa do miR-let7a na fração vesicular antes (V-A) não tratada (PK-) e tratada (PK+) com Proteinase K. (D) Quantificação relativa do miR-let7a e na fração vesicular depois (V-D) não tratada (PK-) e tratada (PK+) com Proteinase K.

6.5 Quantificação relativa dos miRNAs músculo específicos miR-1, -133a, -206 após tratamento com Proteinase K

O primeiro microRNA músculo específico analisado foi miR-1. A Figura 10A e 10B mostra que a quantidade de miRNA circulando de miR-1 foi reduzida na fração do sobrenadante antes da corrida após o tratamento com proteinase K (-2,52 vezes) e na fração sobrenadante depois da corrida após tratamento com proteinase K (-1,06 vez), enquanto que na fração vesicular miR-1 apresentou uma quantidade de miRNA circulando levemente aumentada antes da corrida após tratamento com proteinase K (1,36 vez) e 12,29 vezes aumentada na fração vesicular depois da corrida tratada com Proteinase K (figura 10C e 10D).

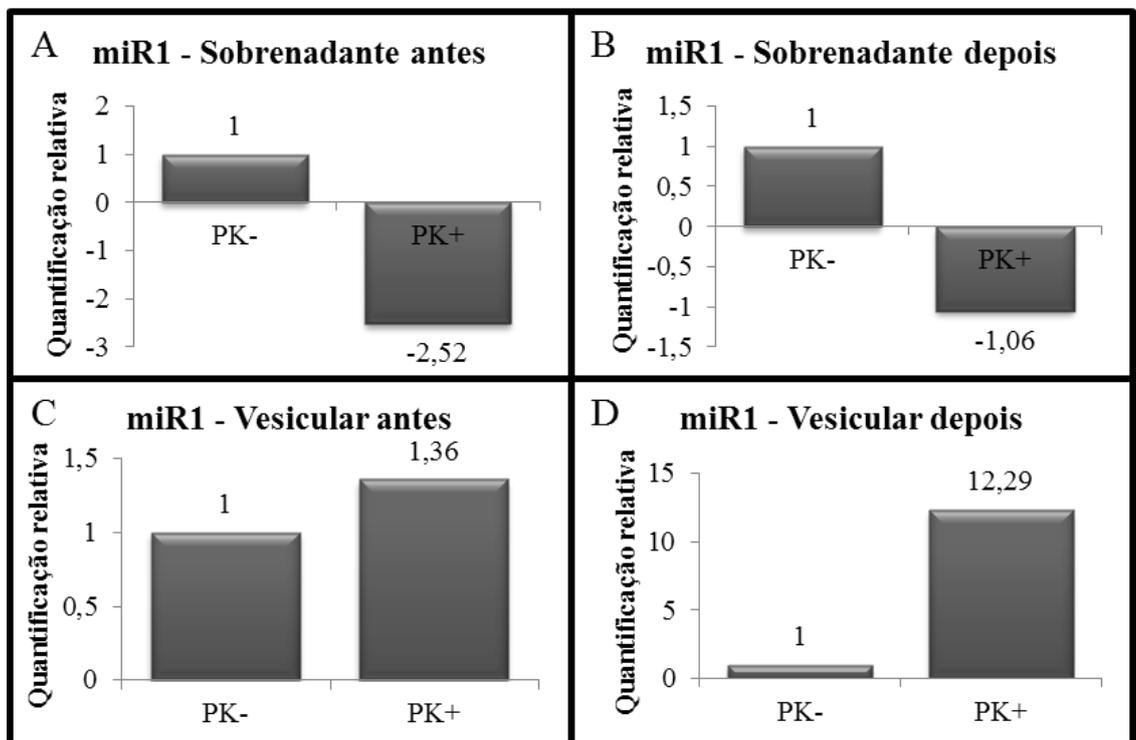


Figura 10: Quantificação relativa do myomiR 1 nas frações plasmática sobrenadante e vesicular tratadas e não tratadas com Proteinase K. (A) Quantificação relativa na fração sobrenadante antes da corrida (S-A) não tratada (PK-) e tratada (PK+) com Proteinase K. (B)

Quantificação relativa na fração sobrenadante depois da corrida (S-D) não tratada (PK-) e tratada com Proteínase K (PK+). (C) Quantificação relativa do miR-1 na fração vesicular antes (V-A) não tratada (PK-) e tratada (PK+) com Proteínase K. (D) Quantificação relativa do miR-1 e na fração vesicular depois (V-D) não tratada (PK-) e tratada (PK+) com Proteínase K.

O segundo myomiR analisado foi miR-133a. A Figura 11A mostra que o miR-133a diminuiu a quantidade presente no plasma em -44,16 vezes na fração sobrenadante antes da corrida após o tratamento com proteínase K, e diminuiu em -17,29 vezes na fração sobrenadante após a corrida tratada com proteínase K (figura 11B). Já na fração vesicular, a redução na quantidade de miRNA circulando foi de -1,24 vez antes da corrida tratada com proteínase K e de -2,01 vezes depois da corrida, após o tratamento com proteínase K (figuras 11C e 11D).

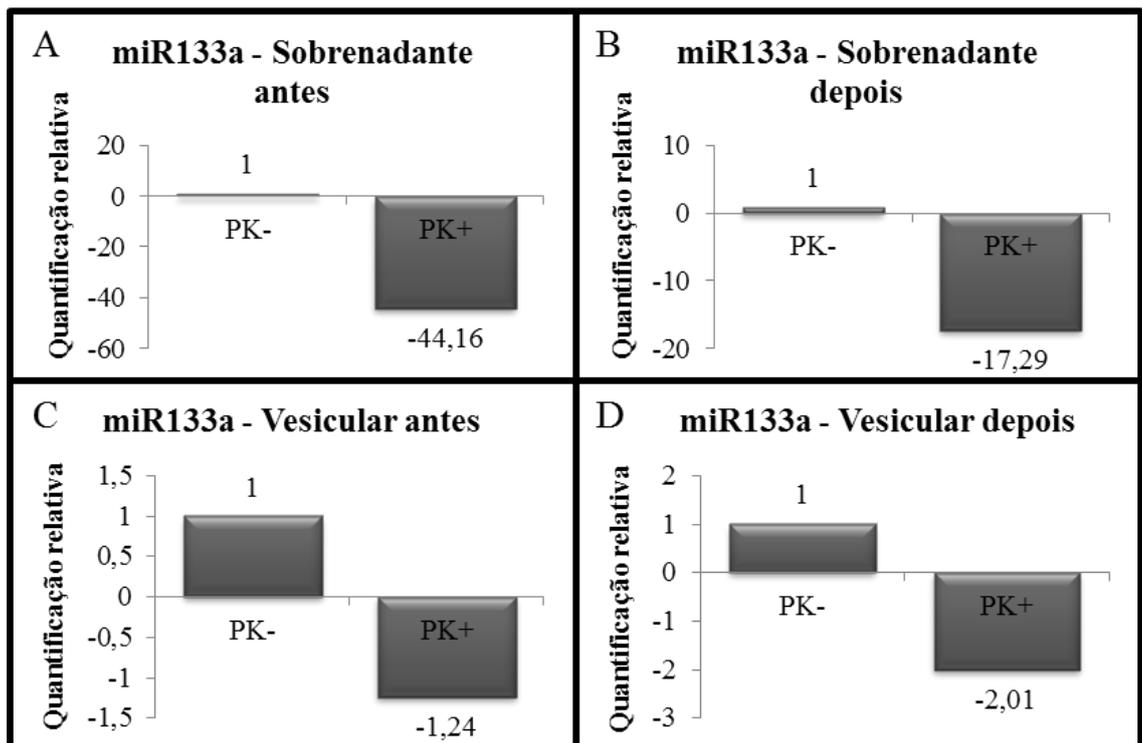


Figura 11: Quantificação relativa do myomiR 133a em quatro frações plasmáticas tratadas e não tratadas com Proteínase K. (A) Quantificação relativa na fração sobrenadante antes da corrida (S-A) não tratada (PK-) e tratada (PK+) com Proteínase K. (B) Quantificação relativa na fração sobrenadante depois da corrida (S-D) não tratada (PK-) e tratada com Proteínase K (PK+). (C) Quantificação relativa do miR-133a na fração vesicular antes (V-A)

não tratada (PK-) e tratada (PK+) com Proteinase K. (D) Quantificação relativa do miR-133a e na fração vesicular depois (V-D) não tratada (PK-) e tratada (PK+) com Proteinase K.

Finalmente, o último myomiR quantificado foi o miR-206. A Figura 12 mostrou que a quantidade de miR-206 circulando aumentou em 14,24 vezes na fração sobrenadante antes após tratamento com proteinase K e aumentou aproximadamente 2,40 vezes na fração sobrenadante após a corrida tratada com proteinase K (figuras 12A e 12B). Já a quantidade de miRNA circulando na fração vesicular mostrou um aumento de aproximadamente 60 vezes na fração vesicular antes tratada com proteinase K e diminuição de -5,92 vezes na fração vesicular depois da corrida após o tratamento (figuras 12C e 12D).

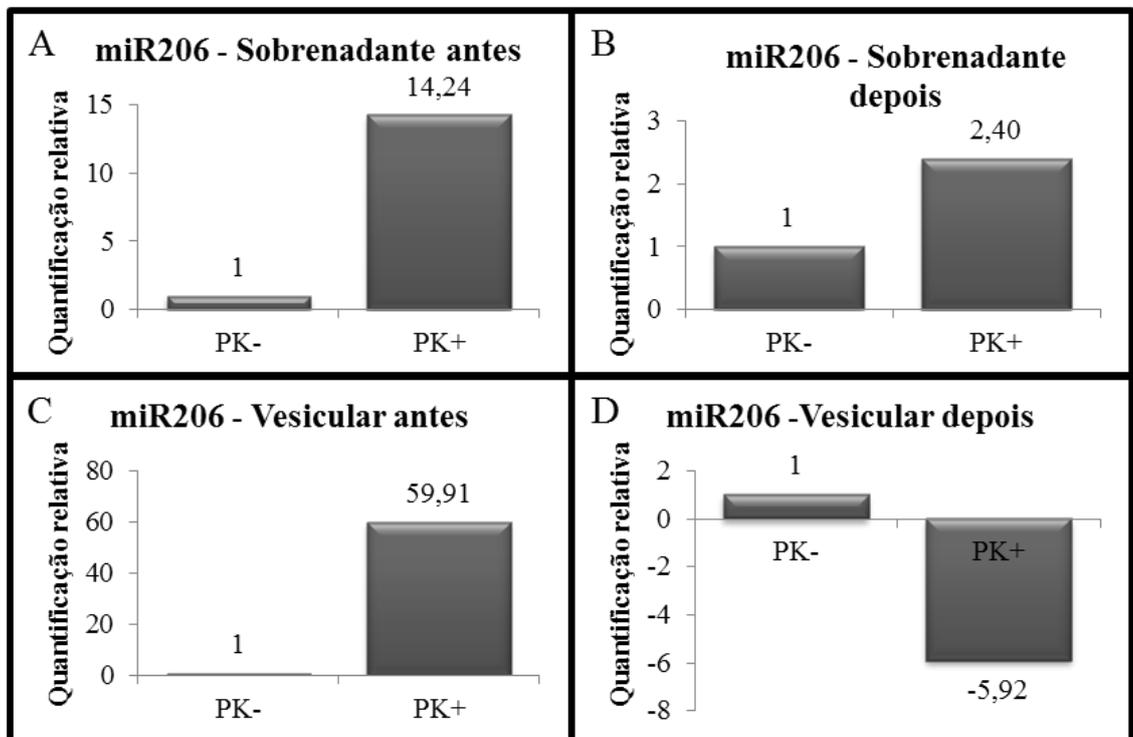


Figura 12: Quantificação relativa do myomiR 206 em quatro frações plasmáticas tratadas e não tratadas com Proteinase K. (A) Quantificação relativa na fração sobrenadante antes da corrida (S-A) não tratada (PK-) e tratada (PK+) com Proteinase K. (B) Quantificação relativa na fração sobrenadante depois da corrida (S-D) não tratada (PK-) e tratada com Proteinase K (PK+). (C) Quantificação relativa do miR-206 na fração vesicular antes (V-A) não tratada (PK-) e tratada (PK+) com Proteinase K. (D) Quantificação relativa do miR-206 e na fração vesicular depois (V-D) não tratada (PK-) e tratada (PK+) com Proteinase K.

7 Discussão

7.1 Purificação das frações sobrenadante e vesicular.

Ao longo do trabalho a fração “pelletada” do tubo de ultra centrífuga foi chamada de vesicular por conter principalmente microvesículas, entre elas, exossomas e lipoproteínas. Como não foi feita uma caracterização das vesículas por microscopia, purificação e separação destas microvesículas, foi atribuído neste trabalho o nome de fração vesicular. As diversas rodadas de centrifugações são importantíssimas para garantir que ao final do ciclo não exista nenhuma célula ou fragmentos celulares e que a quantificação dos miRNAs circulantes no plasma não tenha origem celular. Para garantir a correta quantificação, o descarte do precipitado após as centrifugações a 500 x g e 16.500 x g são suficientes para garantir que não existam mais resíduos de células, corpos apoptóticos e organelas. Em seguida, a ultracentrifugação a 80.000 x g deve ser suficiente para “pelletar” microvesículas, principalmente, exossomas e lipoproteínas. Alguns autores utilizam antes da ultracentrifugação a passagem do fluido por filtro de 0.2 µm (LASSER; ELDH; LOTVALL, 2012). É importante notar que outros tipos de vesículas, além de exossomas e lipoproteínas, podem participar da transferência horizontal de RNA entre as células, um exemplo, são os corpos apoptóticos (VICKERS; REMALEY, 2012).

7.2 Quantificação relativa dos oncomiRs miR-16 e Let7a nas frações plasmáticas após a corrida

Já foi relatado que o exercício físico agudo de ciclismo causou diminuição de 1,23 vezes no miR-16 circulante dentro de neutrófilos (RADOM-AIZIK et al., 2010). O miR-16 circulante no soro já foi utilizado como gene endógeno de referência na análise de modelos animais com distrofia muscular (MIZUNO et al., 2011), porém mostrou grande variação quando o sangue se encontra hemolisado (KIRSCHNER et al., 2011), o que geralmente acontece durante a extração do sangue de atletas submetidos à intensa atividade física. Os dados encontrados no trabalho mostram que os miRNAs exógenos de *C. elegans* adicionados durante a extração como *spike in* são melhores que o uso do miR-16. Possivelmente, para explicar a redução da expressão de miR-16 apenas na fração vesicular depois da corrida, o exercício de endurance pode ser um forte indutor da diminuição da expressão de miR-16 na fração vesicular, ou seja, o exercício pode estar mudando a forma pela qual o miRNA é

transportado, diminuindo o transporte via microvesículas. Outro fator envolvido na diminuição de miR-16 apenas na fração vesicular é que este miRNA é conhecidamente circulante associado à complexos proteicos como Argonauta 2 (ARROYO et al., 2011), e o exercício físico pode ser um estímulo de liberação de outros miRNAs na circulação e o miR-16 deve participar da manutenção de processos celulares dentro da célula.

Já os aumentos encontrados na quantidade de miRNA circulando do miR-let7a tanto na fração sobrenadante quanto vesicular após a corrida podem estar ligados ao mecanismo de regulação no transporte de miRNAs da célula para a circulação causado pelo exercício de endurance. Não existe nenhum artigo publicado até o momento que relaciona o exercício físico com o aumento do miR-let7a, o que já foi relatado é que condições crônicas de privação de alimentação em músculo esquelético leva ao aumento na expressão do miR-let7a alterando o padrão de expressão de proteínas alvos, como Smad4, e essa alteração na expressão do miR-let7a altera as vias de transporte de glicose para a sobrevivência (RAYCHAUDHURI, 2012). O aumento da expressão de miR-let7a na fração vesicular pode estar ligado ao transporte do miRNA associado à microvesículas e também ao rompimento celular causado pelo exercício de endurance, o rompimento de células musculares favorece a liberação de microvesículas e assim a maior expressão do miR-let7a na fração vesicular após a corrida. O miR-let7a foi caracterizado como circulante dentro de exossomas (ARROYO et al., 2011).

Tanto o miR-16 quanto o miR-let7a já foram descritos como circulantes dentro de exossomas na base de dados ExoCarta.

7.3 Quantificação relativa dos miRNAs músculo específico miR-1, -133a e -206 nas frações plasmáticas após a corrida

Em tecido muscular o padrão de expressão de myomiRs foi diferente do encontrado circulando no plasma (NIELSEN et al., 2010). Foi mostrado que o exercício físico agudo de ciclismo em indivíduos destreinados aumentou os níveis de miR-1 e miR-133a, porém miR-133b e miR-206 permaneceram inalterados no músculo vasto lateral durante o pré-treino. Já no pós-treino o nível dos myomiRs no vasto lateral desses indivíduos permaneceram inalterados. Em indivíduos treinados submetidos a treinamento durante 12 semanas de exercício de endurance o nível de myomiRs quantificados mostrou que miR-1, -133a, -133b e -206 diminuiram no músculo vasto lateral durante o pré-treino e após 2 semanas de parada no treinamento os níveis destes myomiRs voltaram ao nível de antes do treinamento (NIELSEN et al., 2010).

Recentemente foi mostrado pelo nosso grupo que o exercício físico de endurance aumenta os níveis dos myomiRs circulantes no plasma do miR-1 em 1,3 vezes, do miR-133a em 1,16 vezes e do miR-206 em 4,3 vezes (GOMES et al., 2012). Para investigar em qual fração plasmática esses miRNAs são encontrados em um *pool* de indivíduos foi feita a quantificação relativa nas frações sobrenadante e vesicular após a corrida, comparadas ao valor arbitrário de antes da corrida = 1.

A única publicação envolvendo miRNAs circulantes e exercício físico foi feita em atletas competitivos em repouso e durante exercício agudo e exercício crônico por 90 dias. Os miRNAs aumentados após o exercício físico agudo e crônico foram os miR-146 e miR-222; Aumentados após o exercício agudo (miR-21 e miR-221); Aumentados apenas após o exercício crônico (miR-20a) e não responsivos (miR-133a, miR-210, miR-328). Os resultados encontrados sugerem o valor potencial dos miRNAs circulantes como biomarcadores de exercícios e seu papel como possível mediador fisiológico da adaptação induzida pelo exercício (BAGGISH et al., 2011). Nossos resultados mostraram uma leve diminuição do miR-1 e do miR-133a nas frações sobrenadante e vesicular do plasma após o exercício diferentemente do que foi encontrado por Baggish, 2011.

Curiosamente os dados mostram que a expressão gênica tanto de miR-1 quanto miR-133a reduziu nas frações do sobrenadante e vesicular após a corrida, indicando que os padrões de expressão dos miRNAs músculo específicos apresentam variação interindividual após o exercício físico de endurance. Possivelmente em alguns indivíduos a expressão de miR-1 e miR-133a foi reduzida após o exercício físico, o que vai em desacordo dos resultados encontrados pelo nosso grupo quando foram analisados os miRNAs no plasma não fracionado. Uma limitação do estudo foi a quantidade de amostra obtida de cada indivíduo antes e após o exercício, impedindo a análise individual dos voluntários.

A purificação das frações por ultracentrifugação é um passo importantíssimo nas análises posteriores, a fim de garantir que não existam miRNA associados à complexos proteicos na fração vesicular e microvesículas na fração do sobrenadante.

Não foram encontrados relatos em publicações explicando o aumento ou diminuição de miRNAs relacionados ao exercício exclusivos em uma fração plasmática.

Os miRNAs circulantes tanto no soro quanto no plasma vêm sendo estudados como possíveis biomarcadores para diversos estados patológicos. O aumento de miR-1 circulante no plasma foi estudado como biomarcador para o infarto agudo do miocárdio e mostrou que pacientes com os primeiros sintomas da doença apresentam aumento neste miRNA

comparado a indivíduos saudáveis (AI et al., 2010; CHENG et al., 2010; KUWABARA et al., 2011; LONG et al., 2012).

O nível de miR-133a circulantes no soro também foi significativamente aumentados em pacientes apresentando infarto agudo do miocárdio, e esse aumento pode ser causado por lesões no miocárdio (KUWABARA et al., 2011). A aumento de miR-133a circulante em monócitos foi relacionado com o aumento de osteoporose pós-menopausa em mulheres caucasianas sendo um promissor biomarcador para esta doença (WANG, Y. et al., 2012).

O aumento na quantidade de miRNA circulando de aproximadamente 150x pelo miR-206 na fração vesicular leva-nos a pensar que este myomiR possivelmente está sendo transportado fortemente associado à vesículas durante a atividade física, e que o exercício de endurance foi o fator indutor da maior liberação deste miRNA no plasma. É um aumento muito maior ao encontrado quando se analisa o plasma não fracionado (4,3 vezes), porém quando se fraciona o plasma percebe-se que o aumento substancial de miR-206 ocorre na fração vesicular e que este valor é diluído pela fração sobrenadante, como ocorrido na análise do plasma não fracionado. Já foi sugerido que a purificação de exossomas aumenta a sensibilidade da amplificação dos miRNAs humanos em fluidos biológicos e que os miRNAs transportados por exossomas devem ser utilizados como ponto de partida de estudos de biomarcadores reduzindo a probabilidade de falsos negativos envolvidos na pequena quantidade de miRNAs quando se usa fluidos biológicos não fracionados (GALLO et al., 2012).

Apesar de ser considerado músculo específico, diferentes níveis de expressão de miR-206 celulares estão sendo estudados em vários tipos de câncer. O nível de expressão mais baixo de miR-206 foi relacionado com níveis de metástases mais elevadas em câncer de pulmão de seis linhagens de tumor pulmonares. Além disso, a super expressão de miR-206 inibiu a migração e invasão de células de câncer de pulmão, concluindo que o nível de expressão de miR-206 é inversamente relacionado com o potencial metastático de câncer de pulmão (WANG et al., 2011). Outro estudo investigou o papel do miR-206 no adenocarcinoma endometrial endometrióide (EEC) positivo para o receptor de estrógeno α (ER- α). Foi mostrado que a expressão do miR-206 estava diminuída em EEC positivos para ER- α e que a super expressão de miR-206 inibia a proliferação, a invasividade e induzia a parada do ciclo celular nestas linhagens celulares, neste artigo o miR-206 é definido como miRNA supressor de tumor (CHEN, X.; YAN; et al., 2012).

O mir-206 circulante no soro foi estudado como possível biomarcador para rabdomiossarcoma (RMS), já que os níveis deste miRNA no soro foram significativamente

maiores em pacientes com tumores RMS do que em pacientes com tumores que não são RMS (MIYACHI et al., 2010). Os níveis dos miRNA músculo específicos circulantes no soro foram estudados como possíveis biomarcadores da distrofia muscular deficiente de distrofina em modelos de camundongos (mdx) e cães (CXMDj) e foi mostrado que os níveis de miR-1, -133a e 206 circulantes no soro foram aumentados tanto em mdx quanto em CXMDj. Os autores ainda mostraram que os níveis desses miRNAs são menos influenciados pelos exercícios em esteira do que o marcador de lesão muscular Creatina Quinase (MIZUNO et al., 2011). Outro ponto interessante neste trabalho mostrou que os níveis de miR-1 e miR-133a foram significativamente diminuídos nos músculos soleus e na tíbia anterior de mdx, já o miR-206 foi significativamente aumentado na tíbia anterior e no diafragma de mdx mostrando que o aumento dos níveis dos miRNAs circulantes estão associados a saída e secreção de miRNAs do músculo e não a mudança de expressão no tecido (MIZUNO et al., 2011).

Também foi mostrado que a expressão de miR-206 em células de carcinoma de laringe (LSCC) foi diminuída e a transfecção de miR-206 inibia a proliferação celular, migração, invasão e tumorigênese nas células LSCC. Além disso, a transfecção de miR-206 diminuiu a expressão do fator de crescimento endotelial VEGF em células LSCC. A diminuição da expressão de miR-206 pode ter importante papel no progresso de células de LSCC e o miR-206 pode funcionar como um promissor miRNA supressor de tumor (ZHANG, T. et al., 2011).

Cabe ressaltar aqui que os valores encontrados de aumento ou diminuição destes miRNAs após a corrida podem ou não estar diretamente relacionados ao aumento ou diminuição do nível de expressão gênica destes miRNAs, o que foi encontrado apenas nos diz sobre a presença dos miRNA circulando no plasma, um exemplo, é que estes miRNAs poderiam estar “estocados” dentro da célula e o estímulo causado pelo exercício físico libera os miRNAs de forma ativa ou passiva na circulação. Outra hipótese é que o nível de expressão gênica destes miRNAs aumenta, levando ao aumento da presença deles circulando dentro de vesículas e complexos proteicos. Estudos avaliando o nível de expressão gênica celular destes miRNAs precisa ser feitos para comprovar essas hipóteses, já que isso não foi o alvo do nosso estudo.

7.4 Quantificação relativa dos OncomiRs miR-16 e Let7a após tratamento com Proteinase K

Estão sendo alvos de estudos as formas pelas quais os miRNAs secretados na circulação permanecem estáveis apesar do grande número de ribonucleases (RNAses). Dois possíveis mecanismos tem sido sugeridos, o primeiro diz que os miRNAs secretados na circulação estão protegidos por estruturas de membranas de microvesículas. O segundo mecanismo diz que os miRNAs secretados na circulação são estabilizados pela associação com proteínas ligantes de RNA, como AGO2. Ambos os mecanismos são capazes de permitir que miRNAs viajem longas distâncias na circulação sem ser degradados pelas RNAses endógenas (CHEN, X.; LIANG; et al., 2012). O fracionamento do plasma em frações sobrenadante e vesicular foi feito por ultracentrifugação como forma de separar miRNAs associados a proteínas e vesículas. Os miRNAs associados a proteínas permanecem na parte do sobrenadante do tubo e os miRNAs associados a vesículas permanecem na fração do precipitado do tubo (vesicular) . Como não foi utilizado nenhum método de confirmação de proteínas marcadoras de exossomas na fração vesicular, os miRNAs identificados nesta fração foram chamados como associados à microvesículas. Em seguida, o tratamento com Proteinase K foi feito para avaliar a estabilidade dos miRNAs quando expostos às RNAses endógenas. Para os miRNAs transportados por proteínas, o tratamento com Proteinase K desestabilizaria esta associação e o miRNA seria rapidamente degradado pela grande quantidade de RNAses endógenas, como é conhecido quando se insere oligonucleotídeos sintéticos diretamente no plasma (MITCHELL, P.S. et al., 2008). A forma de transporte dos miRNAs circulantes ainda não é bem estabelecida, alguns autores sugerem que a maioria dos miRNAs circula no plasma associados à proteínas (ARROYO et al., 2011; TURCHINOVICH et al., 2011), associados à lipoproteínas de alta densidade (HDL) (VICKERS et al., 2011) enquanto outros sugerem que a maioria de miRNAs circula no plasma associados à microvesículas (GALLO et al., 2012).

Os dois oncomiRs miR-16 e miR-let7a foram escolhidos por estarem bem caracterizados associados à complexos proteicos na fração sobrenadante e à microvesículas na fração vesicular, respectivamente (ARROYO et al., 2011). No caso do oncomiRs let7a, caracterizado como associado à microvesículas, o padrão de estabilidade observado após o tratamento com proteinase K sugere que este miRNAs é transportado no plasma associado à microvesículas. O padrão que se deve observar de miRNAs associados à microvesículas após o tratamento com proteinase K é uma inalteração, ou leve diminuição ou aumento na expressão gênica na fração do sobrenadante, como foi mostrando na figura 9 mostra uma pequena redução no nível de expressão de miR-let7a na fração após o tratamento de proteinase K em comparação com a quantificação do miR16, enquanto as figuras 9B e 9D mostram um aumento na quantificação relativa do miR-16 em 2,5 e 8 vezes, respectivamente.

Os resultados encontrados após o tratamento com proteinase K tanto no miR-16 quanto no miR-let7a corroboram com o encontrado na literatura e garante que o tratamento escolhido com Proteinase K funcionou como o esperado. O próximo passo foi analisar o perfil de expressão dos miRNA músculo específicos submetidos ao tratamento com Proteinase K.

7.5 Quantificação relativa dos miRNAs músculo específicos miR-1, -133a, -206 após tratamento com Proteinase K

O padrão de quantificação de miRNA após o tratamento com proteinase K dos miRNA músculo específicos foi comparado com os resultados encontrados do miR-16 e miR-let7a.

O perfil de quantificação de miRNA encontrado pelo miR-1, se aproxima com o resultado encontrado pelo miR-let7a, ou seja, o tratamento com Proteinase K, não foi capaz de reduzir a quantificação destes miRNAs tanto nas frações sobrenadante quanto vesicular. O que indica que tanto miR-1 quanto miR-let7a são transportados preferencialmente associado a microvesículas quando o estímulo estudado é o exercício físico de endurance.

Já o resultado de quantificação de miRNA do miR-133a após tratamento com proteinase K nas frações plasmáticas mostra fortemente que o miR-133a reduziu substancialmente seus níveis após o tratamento indicando que este miRNA é desestabilizado pelo tratamento com Proteinase K, mostrando redução na quantificação em 45 vezes na fração sobrenadante antes da corrida, e diminuição em 17 vezes na fração sobrenadante após a corrida tratada com proteinase K, o que não ocorreu na fração vesicular. Logo, quando o miR-133a é desestabilizado da associação com proteínas, ele é exposto às RNases endógenas presentes no plasma e rapidamente degradado em apenas uma fração plasmática, indicando que o miR-133a é transportado por complexos proteicos. A Proteína Argonauta2, que foi mostrada associada à muitos miRNA (ARROYO et al., 2011; TURCHINOVICH et al., 2011), pode ser uma candidata forte no transporte do miR-133a. Alternativamente, está sendo feito em nosso laboratório a análise de proteínas diferentemente expressas na fração do sobrenadante, para buscar proteínas que aparecem juntas de miRNAs participando do transporte no plasma.

O miR-206 parece ser o miRNA músculo específico circulante no plasma mais responsivo ao exercício de endurance. O padrão de quantificação de miRNA nas frações do plasma antes do tratamento e após o tratamento com proteinase K indicam que o miR-206 é transportado ativamente em resposta ao exercício físico, principalmente associado à

microvesículas. Entre as microvesículas possivelmente envolvidas no transporte de miR-206 durante a atividade física estão os exossomas e também lipoproteínas de alta densidade (HDL), que já foram mostradas envolvidas no transporte de miRNA (GALLO et al., 2012; VICKERS et al., 2011).

A forma de transporte de miRNAs circulantes no plasma ainda está longe de ser um consenso, já que algumas publicações sugerem que a maioria dos miRNAs é transportado em complexos proteicos enquanto outras afirmam que os exossomas são os grandes responsáveis por essa função. Evidências indicam que o mesmo miRNA circulante pode ser transportado de várias formas, como exemplo, o miR-16 que foi caracterizado associado à complexos proteicos já foi encontrado associado a exossomas na base de dados do ExoCarta. Logo, parece que o transporte de miRNAs depende do estímulo ou de mecanismos patogênicos que induzem o transporte ativamente ou passivamente. Já foi mostrado que miRNAs extracelulares podem ser liberados passivamente pela lesão dos tecidos, processos inflamatórios, apoptose ou necrose celular. Entre os mecanismos ativos de secreção de miRNAs estão os eventos de sinalização entre células, onde os miRNA circulam dentro de microvesículas e de proteínas ligantes a RNA (CHEN, X.; LIANG; et al., 2012). Mais estudos devem ser feitos para se entender os mecanismos moleculares que participam dos benefícios da atividade física à saúde, para buscar entender melhor os mecanismo de transferência horizontal de informação entre as células causados pelos miRNAs circulantes, o destino final de um miRNA circulante liberado pelo exercício físico e assim buscar entender o papel fisiológico da transferência de miRNA entre diferentes células e diferentes tecidos.

Por fim, os dados gerados neste trabalho foram resumidos na figura 13, que ilustra a resposta dos miRNAs músculo específicos miR-1, miR-133a e miR-206 assim como os oncomiRs miR-16 e let-7a após o estresse causado pelo exercício físico de endurance. A figura 13 ilustra conforme o tratamento com Proteinase K a forma pela qual estes miRNAs circulam no plasma. Os miRNAs miR-1, miR-206 e mir-Let7a circulam associados à microvesículas enquanto miR-133a e miR-16 circulam associados à complexos proteicos.

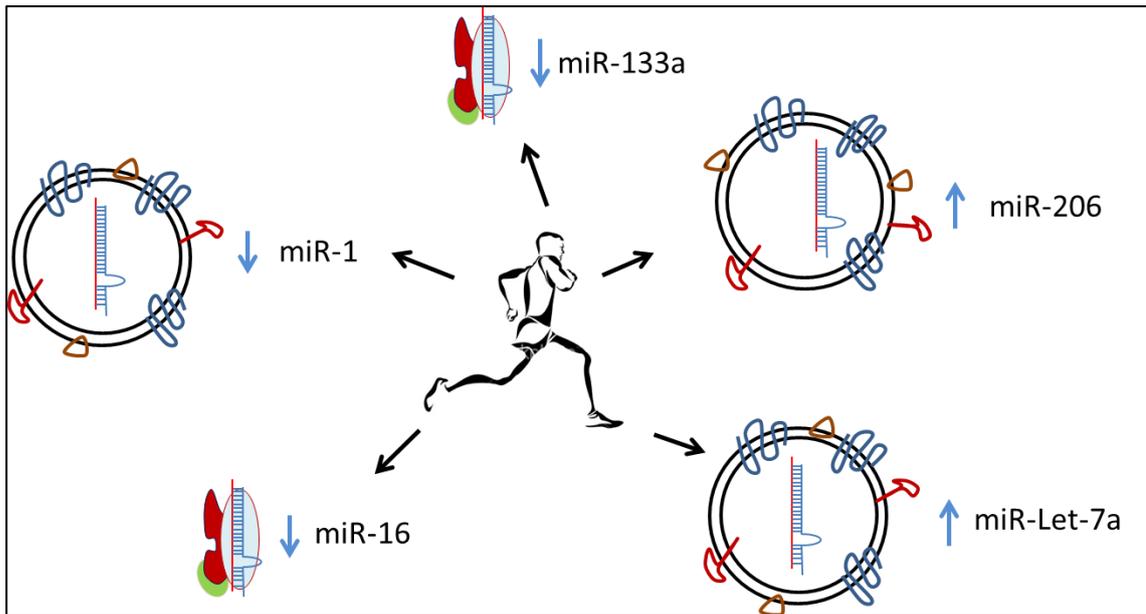


Figura 13: Mecanismo pelo qual o exercício físico altera a quantidade de miRNAs circulantes no plasma de atletas recreacionais. O exercício físico de endurance levou ao aumento na quantidade de miR-let7a e miR-206 associados à microvesículas, e a diminuição da quantidade de miR-1 associado à microvesículas e miR-16 e miR-133a associados à complexos proteicos.

8 Conclusões

Foi mostrado no trabalho que a quantificação relativa do miR-16 na fração vesicular do plasma de corredores submetidos a exercício físico de endurance apresentou um leve aumento, tornando miR-16 um gene endógeno que não deve ser utilizado como gene de referência para análises de plasma sanguíneo.

O miR-206 aumentou a quantificação substancialmente na fração vesicular do plasma após o exercício de endurance, indicando ser um miRNA altamente responsivo ao estresse causado pelo exercício físico de endurance.

A quantificação relativa do miR-1 após tratamento com proteinase K indicou que ele é transportado por microvesículas após estímulo causado pelo exercício, da mesma forma que miR-206.

Já o padrão de quantificação do miR-133a após tratamento com proteinase K na fração sobrenadante indicou fortemente que este miRNA circula dentro do plasma e pode estar associados a complexos proteicos durante o exercício de endurance.

9 Referências Bibliográficas

AI, J.; ZHANG, R.; LI, Y.; PU, J.; LU, Y.; JIAO, J.; LI, K.; YU, B.; LI, Z.; WANG, R.; WANG, L.; LI, Q.; WANG, N.; SHAN, H.; YANG, B. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 391, n. 1, p. 73-7, Jan 1 2010.

ALLIS, C. D.; JENUWEIN, T.; REINBERG, D. **Epigenetics**. New York: John Inglis, 2007.

ALMEIDA, M. I.; REIS, R. M.; CALIN, G. A. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 2011.

ARROYO, J. D.; CHEVILLET, J. R.; KROH, E. M.; RUF, I. K.; PRITCHARD, C. C.; GIBSON, D. F.; MITCHELL, P. S.; BENNETT, C. F.; POGOSOVA-AGADJANYAN, E. L.; STIREWALT, D. L.; TAIT, J. F.; TEWARI, M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2011.

AVERY, O. T.; MACLEOD, C. M.; MCCARTY, M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. **The Journal of experimental medicine**, v. 79, n. 2, p. 137-58, Feb 1 1944.

BAAR, K. Involvement of PPAR γ co-activator-1, nuclear respiratory factors 1 and 2, and PPAR α in the adaptive response to endurance exercise. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, n. 2, p. 269-274, 2004.

BAGGISH, A. L.; HALE, A.; WEINER, R. B.; LEWIS, G. D.; SYSTROM, D.; WANG, F.; WANG, T. J.; CHAN, S. Y. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. **The Journal of physiology**, v. 589, n. Pt 16, p. 3983-94, Aug 15 2011.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004.

BERRETTA, J.; MORILLON, A. Pervasive transcription constitutes a new level of eukaryotic genome regulation. **EMBO Rep**, v. 10, n. 9, p. 973-82, Sep 2009.

BICKEL, C. S.; SLADE, J.; MAHONEY, E.; HADDAD, F.; DUDLEY, G. A.; ADAMS, G. R. Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. **J Appl Physiol**, v. 98, n. 2, p. 482-8, Feb 2005.

BIRNEY, E.; STAMATOYANNOPOULOS, J. A.; DUTTA, A.; GUIGÓ, R.; GINGERAS, T. R.; MARGULIES, E. H.; WENG, Z.; SNYDER, M.; DERMITZAKIS, E. T.; THURMAN, R. E. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. **Nature**, v. 447, n. 7146, p. 799-816, 2007.

BLAIR, S.; POWELL, K.; BAZZARRE, T.; EARLY, J.; EPSTEIN, L.; GREEN, L.; HARRIS, S.; HASKELL, W.; KING, A.; KOPLAN, J. Physical inactivity. Workshop V. AHA Prevention Conference III. Behavior change and compliance: keys to improving cardiovascular health. **Circulation**, v. 88, n. 3, p. 1402-1405, 1993.

BOOTH, F. W.; CHAKRAVARTHY, M. V.; GORDON, S. E.; SPANGENBURG, E. E. Waging war on physical inactivity: using modern molecular ammunition against an ancient enemy. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, n. 1, p. 3-30, 2002.

BOOTH, F. W.; GORDON, S. E.; CARLSON, C. J.; HAMILTON, M. T. Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. **Journal of Applied Physiology**, v. 88, n. 2, p. 774-787, 2000.

BOOTH, F. W.; TSENG, B. S. America needs to exercise for health. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 27, n. 3, p. 462, 1995.

BRADBURY, J. Human epigenome project--up and running. **PLoS Biol**, v. 1, n. 3, p. E82, 2003.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**, v. 55, n. 4, p. 611-22, Apr 2009.

CABY, M. P.; LANKAR, D.; VINCENDEAU-SCHERRER, C.; RAPOSO, G.; BONNEROT, C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. **International immunology**, v. 17, n. 7, p. 879-887, 2005.

CHAKRAVARTHY, M. V.; BOOTH, F. W. Eating, exercise, and "thrifty" genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 1, p. 3-10, 2004.

CHEN, J. F.; MANDEL, E. M.; THOMSON, J. M.; WU, Q.; CALLIS, T. E.; HAMMOND, S. M.; CONLON, F. L.; WANG, D. Z. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. **Nat Genet**, v. 38, n. 2, p. 228-33, 2006.

CHEN, X.; LIANG, H.; ZHANG, J.; ZEN, K.; ZHANG, C. Y. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. **Trends Cell Biol**, v. 22, n. 3, p. 125-32, Mar 2012.

CHEN, X.; YAN, Q.; LI, S.; ZHOU, L.; YANG, H.; YANG, Y.; LIU, X.; WAN, X. Expression of the tumor suppressor miR-206 is associated with cellular proliferative inhibition and impairs invasion in ER α -positive endometrioid adenocarcinoma. **Cancer letters**, v. 314, n. 1, p. 41-53, Jan 1 2012.

CHENG, Y.; TAN, N.; YANG, J.; LIU, X.; CAO, X.; HE, P.; DONG, X.; QIN, S.; ZHANG, C. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. **Clinical science**, v. 119, n. 2, p. 87-95, Jul 2010.

CORTEZ, M. A.; BUESO-RAMOS, C.; FERDIN, J.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; SOOD, A. K.; CALIN, G. A. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 8, n. 8, p. 467-477, 2011.

D'ALESSANDRA, Y.; DEVANNA, P.; LIMANA, F.; STRAINO, S.; DI CARLO, A.; BRAMBILLA, P. G.; RUBINO, M.; CARENA, M. C.; SPAZZAFUMO, L.; DE SIMONE, M.; MICHELI, B.; BIGLIOLI, P.; ACHILLI, F.; MARTELLI, F.; MAGGIOLINI, S.; MARENZI, G.; POMPILIO, G.; CAPOGROSSI, M. C. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. **Eur Heart J**, v. 31, n. 22, p. 2765-73, Nov 2010.

DAVIDSEN, P. K.; GALLAGHER, I. J.; HARTMAN, J. W.; TARNOPOLSKY, M. A.; DELA, F.; HELGE, J. W.; TIMMONS, J. A.; PHILLIPS, S. M. High responders to resistance exercise training demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNA expression. **J Appl Physiol**, v. 110, n. 2, p. 309-17, Feb 2011.

DAVIS-DUSENBERY, B. N.; HATA, A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. **Journal of biochemistry**, v. 148, n. 4, p. 381-392, 2010.

DAVIS, B. N.; HATA, A. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. **Cell Commun Signal**, v. 7, n. 1, p. 18, 2009.

DEY, B. K.; GAGAN, J.; DUTTA, A. miR-206 and-486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7. **Molecular and cellular biology**, v. 31, n. 1, p. 203-214, 2011.

DUPONT, C.; ARMANT, D. R.; BRENNER, C. A. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. **Semin Reprod Med**, v. 27, n. 5, p. 351-7, Sep 2009.

FREZZETTI, D.; REALE, C.; CALI, G.; NITSCH, L.; FAGMAN, H.; NILSSON, O.; SCARFO, M.; DE VITA, G.; DI LAURO, R. The microRNA-processing enzyme Dicer is essential for thyroid function. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27648, 2011.

FRITH, M. C.; PHEASANT, M.; MATTICK, J. S. Genomics: The amazing complexity of the human transcriptome. **European Journal of Human Genetics**, v. 13, n. 8, p. 894-897, 2005.

GALLO, A.; TANDON, M.; ALEVIZOS, I.; ILLEI, G. G. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e30679, 2012.

GARCIA, M.; JEMAL, A.; WARD, E.; CENTER, M.; HAO, Y.; SIEGEL, R.; THUN, M. **Global Cancer Facts & Figures 2007**. Atlanta, GA: American Cancer Society 2007.

GOMES, C.P.C.; OLIVEIRA-JR, G.P.; MADRID, B.; ALMEIDA, J.A.; FRANCO, O.L.; PEREIRA, R.W.; Evaluation of Plasma Circulating Muscle Specific MicroRNAs Before and After a Half-Marathon Run. **Plos One (submitted)**. 2012.

GROSSHANS, H.; FILIPOWICZ, W. Molecular biology: the expanding world of small RNAs. **Nature**, v. 451, n. 7177, p. 414-6, Jan 24 2008.

HA, T. Y. MicroRNAs in Human Diseases: From Lung, Liver and Kidney Diseases to Infectious Disease, Sickle Cell Disease and Endometrium Disease. **Immune Network**, v. 11, n. 6, p. 309, 2011.

HAVENS, M. A.; REICH, A. A.; DUELLI, D. M.; HASTINGS, M. L. Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. **Nucleic acids research**, Jan 23 2012.

HAWLEY, J. A.; HOLLOSZY, J. O. Exercise: it's the real thing! **Nutrition reviews**, v. 67, n. 3, p. 172-8, 2009.

HAWLEY, J. A. H. J. A. Molecular responses to strength and endurance training: Are they incompatible? This paper article is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 14th International Biochemistry of Exercise Conference-Muscles as Molecular and Metabolic Machines, and has undergone the Journal's usual peer review process. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 34, n. 3, p. 355-361, 2009.

HERSHEY, A. D.; CHASE, M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. **J Gen Physiol**, v. 36, n. 1, p. 39-56, May 1952.

JACQUIER, A. The complex eukaryotic transcriptome: unexpected pervasive transcription and novel small RNAs. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 12, p. 833-844, 2009.

JOSEPH, A. M.; PILEGAARD, H.; LITVINTSEV, A.; LEICK, L.; HOOD, D. A. Control of gene expression and mitochondrial biogenesis in the muscular adaptation to endurance exercise. **Essays Biochem**, v. 42, p. 13-29, 2006.

KATZMARZYK, P. T.; CHURCH, T. S.; BLAIR, S. N. Cardiorespiratory fitness attenuates the effects of the metabolic syndrome on all-cause and cardiovascular disease mortality in men. **Archives of internal medicine**, v. 164, n. 10, p. 1092-7, 2004.

KIM, H. K.; LEE, Y. S.; SIVAPRASAD, U.; MALHOTRA, A.; DUTTA, A. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. **The Journal of cell biology**, v. 174, n. 5, p. 677-687, 2006.

KIRSCHNER, M. B.; KAO, S. C.; EDELMAN, J. J.; ARMSTRONG, N. J.; VALLELY, M. P.; VAN ZANDWIJK, N.; REID, G. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24145, 2011.

KORTHUIS, R. J. In: (Ed.). **Skeletal Muscle Circulation**. San Rafael (CA), 2011.

KOSAKA, N.; IGUCHI, H.; OCHIYA, T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. **Cancer science**, v. 101, n. 10, p. 2087-92, Oct 2010.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. Database issue, p. D152-7, Jan 2011.

KROH, E. M.; PARKIN, R. K.; MITCHELL, P. S.; TEWARI, M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). **Methods**, v. 50, n. 4, p. 298-301, 2010.

KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILIPOWICZ, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nature reviews. Genetics**, v. 11, n. 9, p. 597-610, Sep 2010.

KUWABARA, Y.; ONO, K.; HORIE, T.; NISHI, H.; NAGAO, K.; KINOSHITA, M.; WATANABE, S.; BABA, O.; KOJIMA, Y.; SHIZUTA, S.; IMAI, M.; TAMURA, T.; KITA, T.; KIMURA, T. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. **Circ Cardiovasc Genet**, v. 4, n. 4, p. 446-54, Aug 1 2011.

LASSER, C.; ELDH, M.; LOTVALL, J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 59, p. e3037, 2012.

LAWRIE, C. H.; GAL, S.; DUNLOP, H. M.; PUSHKARAN, B.; LIGGINS, A. P.; PULFORD, K.; BANHAM, A. H.; PEZZELLA, F.; BOULTWOOD, J.; WAINSCOAT, J. S.; HATTON, C. S.; HARRIS, A. L. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. **British journal of haematology**, v. 141, n. 5, p. 672-5, May 2008.

LEE, H. M.; CHOI, E. J.; KIM, J. H.; KIM, T. D.; KIM, Y. K.; KANG, C.; GHO, Y. S. A membranous form of ICAM-1 on exosomes efficiently blocks leukocyte adhesion to activated endothelial cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 397, n. 2, p. 251-256, 2010.

LIU, Q.; FU, H.; SUN, F.; ZHANG, H.; TIE, Y.; ZHU, J.; XING, R.; SUN, Z.; ZHENG, X. miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 16, p. 5391-404, Sep 2008.

LONG, G.; WANG, F.; DUAN, Q.; CHEN, F.; YANG, S.; GONG, W.; WANG, Y.; CHEN, C.; WANG, D. W. Human Circulating MicroRNA-1 and MicroRNA-126 as Potential Novel Indicators for Acute Myocardial Infarction. **Int J Biol Sci**, v. 8, n. 6, p. 811-8, 2012.

LOTVALL, J.; VALADI, H. Cell to cell signalling via exosomes through esRNA. **Cell adhesion & migration**, v. 1, n. 3, p. 156, 2007.

MA, R.; BULLOCK, E.; MAYNARD, P.; REEDY, B.; SHIMMON, R.; LENNARD, C.; ROUX, C.; MCDONAGH, A. Fingerprint detection on non-porous and semi-porous surfaces using NaYF₄:Er,Yb up-converter particles. **Forensic science international**, v. 207, n. 1-3, p. 145-9, Apr 15 2011.

MACFARLANE, L. A.; MURPHY, P. R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. **Current genomics**, v. 11, n. 7, p. 537-61, Nov 2010.

MARINI, M.; VEICSTEINAS, A. The exercised skeletal muscle: a review. **Eur J Translat Myology**, v. 20, n. 3, p. 105-20, 2010.

MATHIVANAN, S.; FAHNER, C. J.; REID, G. E.; SIMPSON, R. J. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. **Nucleic acids research**, v. 40, n. Database issue, p. D1241-4, Jan 2012.

MATHIVANAN, S.; SIMPSON, R. J. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. **Proteomics**, v. 9, n. 21, p. 4997-5000, Nov 2009.

MATTICK, J. S.; MAKUNIN, I. V. Non-coding RNA. **Human molecular genetics**, v. 15, n. suppl 1, p. R17-R29, 2006.

MCCARTHY, J. J. MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1779, n. 11, p. 682-691, 2008.

MCCARTHY, J. J.; ESSER, K. A. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. **J Appl Physiol**, v. 102, n. 1, p. 306-13, 2007.

MITCHELL, P. S.; PARKIN, R. K.; KROH, E. M.; FRITZ, B. R.; WYMAN, S. K.; POGOSOVA-AGADJANYAN, E. L.; PETERSON, A.; NOTEBOOM, J.; O'BRIANT, K. C.; ALLEN, A.; LIN, D. W.; URBAN, N.; DRESCHER, C. W.; KNUDSEN, B. S.; STIREWALT, D. L.; GENTLEMAN, R.; VESSELLA, R. L.; NELSON, P. S.; MARTIN, D. B.; TEWARI, M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 30, p. 10513-8, 2008.

MIYACHI, M.; TSUCHIYA, K.; YOSHIDA, H.; YAGYU, S.; KIKUCHI, K.; MISAWA, A.; IEHARA, T.; HOSOI, H. Circulating muscle-specific microRNA, miR-206, as a potential diagnostic marker for rhabdomyosarcoma. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 400, n. 1, p. 89-93, Sep 10 2010.

MIZUNO, H.; NAKAMURA, A.; AOKI, Y.; ITO, N.; KISHI, S.; YAMAMOTO, K.; SEKIGUCHI, M.; TAKEDA, S.; HASHIDO, K. Identification of muscle-specific microRNAs in serum of muscular dystrophy animal models: promising novel blood-based markers for muscular dystrophy. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e18388, 2011.

MOKDAD, A. H.; MARKS, J. S.; STROUP, D. F.; GERBERDING, J. L. Actual causes of death in the United States, 2000. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 291, n. 10, p. 1238-1245, 2004.

MYERS, J.; KAYKHA, A.; GEORGE, S.; ABELLA, J.; ZAHEER, N.; LEAR, S.; YAMAZAKI, T.; FROELICHER, V. Fitness versus physical activity patterns in predicting mortality in men. **The American journal of medicine**, v. 117, n. 12, p. 912-8, 2004.

NEEL, J. V. Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? **American journal of human genetics**, v. 14, n. 4, p. 353, 1962.

NIELSEN, S.; SCHEELE, C.; YFANTI, C.; AKERSTROM, T. C.; NIELSEN, A. R.; PEDERSEN, B. K.; LAYE, M. J. Muscle Specific MicroRNAs are regulated by Endurance Exercise in Human Skeletal Muscle. **J Physiol**, v. 588, n. 20, p. 4029-4037, 2010.

PISITKUN, T.; JOHNSTONE, R.; KNEPPER, M. A. Discovery of urinary biomarkers. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 5, n. 10, p. 1760-71, Oct 2006.

RADOM-AIZIK, S.; ZALDIVAR, F., JR.; OLIVER, S.; GALASSETTI, P.; COOPER, D. M. Evidence for microRNA involvement in exercise-associated neutrophil gene expression changes. **J Appl Physiol**, v. 109, n. 1, p. 252-61, Jul 2010.

RANEY, B. J.; CLINE, M. S.; ROSENBLOOM, K. R.; DRESZER, T. R.; LEARNED, K.; BARBER, G. P.; MEYER, L. R.; SLOAN, C. A.; MALLADI, V. S.; ROSKIN, K. M.

ENCODE whole-genome data in the UCSC genome browser (2011 update). **Nucleic acids research**, v. 39, n. suppl 1, p. D871-D875, 2011.

RAO, P. K.; MISSIAGLIA, E.; SHIELDS, L.; HYDE, G.; YUAN, B.; SHEPHERD, C. J.; SHIPLEY, J.; LODISH, H. F. Distinct roles for miR-1 and miR-133a in the proliferation and differentiation of rhabdomyosarcoma cells. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 9, p. 3427-3437, 2010.

RATAJCZAK, J.; WYSOCZYNSKI, M.; HAYEK, F.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.; RATAJCZAK, M. Z. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.**, v. 20, n. 9, p. 1487-95, Sep 2006.

RAYCHAUDHURI, S. MicroRNAs overexpressed in growth-restricted rat skeletal muscles regulate the glucose transport in cell culture targeting central TGF-beta factor SMAD4. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e34596, 2012.

RISSLAND, O. S.; HONG, S. J.; BARTEL, D. P. MicroRNA destabilization enables dynamic regulation of the miR-16 family in response to cell-cycle changes. **Molecular cell**, v. 43, n. 6, p. 993-1004, Sep 16 2011.

RODGERS, J. T.; LERIN, C.; GERHART-HINES, Z.; PUIGSERVER, P. Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. **FEBS Lett**, v. 582, n. 1, p. 46-53, Jan 9 2008.

ROTH, S. M. MicroRNAs: playing a big role in explaining skeletal muscle adaptation? **Journal of Applied Physiology**, v. 110, n. 2, p. 301-302, 2011.

SCHOFIELD, C. M.; HSU, R.; BARKER, A. J.; GERTZ, C. C.; BLELLOCH, R.; ULLIAN, E. M. Monoallelic deletion of the microRNA biogenesis gene Dgcr8 produces deficits in the development of excitatory synaptic transmission in the prefrontal cortex. **Neural development**, v. 6, p. 11, 2011.

SHIRDEL, E. A.; XIE, W.; MAK, T. W.; JURISICA, I. NAViGaTing the micronome--using multiple microRNA prediction databases to identify signalling pathway-associated microRNAs. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17429, 2011.

SIGAL, R. J.; KENNY, G. P.; WASSERMAN, D. H.; CASTANEDA-SCEPPA, C. Physical activity/exercise and type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 10, p. 2518-39, Oct 2004.

SIMPSON, R. J.; LIM, J. W.; MORITZ, R. L.; MATHIVANAN, S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. **Expert review of proteomics**, v. 6, n. 3, p. 267-83, Jun 2009.

TAFT, R. J.; PANG, K. C.; MERCER, T. R.; DINGER, M.; MATTICK, J. S. Non-coding RNAs: regulators of disease. **J Pathol**, v. 220, n. 2, p. 126-39, Jan 2010.

TURCHINOVICH, A.; WEIZ, L.; LANGHEINZ, A.; BURWINKEL, B. Characterization of extracellular circulating microRNA. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 16, p. 7223-7233, 2011.

VALADI, H.; EKSTROM, K.; BOSSIOS, A.; SJOSTRAND, M.; LEE, J. J.; LOTVALL, J. O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nat Cell Biol**, v. 9, n. 6, p. 654-9, 2007.

VAN NIEL, G.; PORTO-CARREIRO, I.; SIMOES, S.; RAPOSO, G. Exosomes: a common pathway for a specialized function. **Journal of biochemistry**, v. 140, n. 1, p. 13-21, 2006.

VAN ROOIJ, E.; LIU, N.; OLSON, E. N. MicroRNAs flex their muscles. **Trends in Genetics**, v. 24, n. 4, p. 159-166, 2008.

VICKERS, K. C.; PALMISANO, B. T.; SHOUCRI, B. M.; SHAMBUREK, R. D.; REMALEY, A. T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. **Nat Cell Biol**, v. 13, n. 4, p. 423-33, 2011.

VICKERS, K. C.; REMALEY, A. T. Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication. **Curr Opin Lipidol**, v. 23, n. 2, p. 91-7, Apr 2012.

WANG, D. J.; LEGESSE-MILLER, A.; JOHNSON, E. L.; COLLER, H. A. Regulation of the let-7a-3 Promoter by NF- κ B. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31240, 2012.

WANG, X.; LING, C.; BAI, Y.; ZHAO, J. MicroRNA-206 is associated with invasion and metastasis of lung cancer. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 294, n. 1, p. 88-92, Jan 2011.

WANG, Y.; LI, L.; MOORE, B. T.; PENG, X. H.; FANG, X.; LAPPE, J. M.; RECKER, R. R.; XIAO, P. MiR-133a in human circulating monocytes: a potential biomarker associated with postmenopausal osteoporosis. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e34641, 2012.

WESSEL, T. R.; ARANT, C. B.; OLSON, M. B.; JOHNSON, B. D.; REIS, S. E.; SHARAF, B. L.; SHAW, L. J.; HANDBERG, E.; SOPKO, G.; KELSEY, S. F.; PEPINE, C. J.; MERZ, N. B. Relationship of physical fitness vs body mass index with coronary artery disease and cardiovascular events in women. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 292, n. 10, p. 1179-87, 2004.

WISLØFF, U.; NAJJAR, S. M.; ELLINGSEN, Ø.; HARAM, P. M.; SWOAP, S.; AL-SHARE, Q.; FERNSTRÖM, M.; REZAEI, K.; LEE, S. J.; KOCH, L. G. Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. **Science**, v. 307, n. 5708, p. 418-420, 2005.

YANG, T. T.; WENG, S. F.; ZHENG, N.; PAN, Q. H.; CAO, H. L.; LIU, L.; ZHANG, H. D.; MU DA, W. Histopathology mapping of biochemical changes in myocardial infarction by Fourier transform infrared spectral imaging. **Forensic science international**, v. 207, n. 1-3, p. e34-9, Apr 15 2011.

ZEN, K.; ZHANG, C. Y. Circulating MicroRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. **Medicinal research reviews**, Nov 9 2010.

ZHANG, L.; HOU, D.; CHEN, X.; LI, D.; ZHU, L.; ZHANG, Y.; LI, J.; BIAN, Z.; LIANG, X.; CAI, X.; YIN, Y.; WANG, C.; ZHANG, T.; ZHU, D.; ZHANG, D.; XU, J.; CHEN, Q.; BA, Y.; LIU, J.; WANG, Q.; CHEN, J.; WANG, J.; WANG, M.; ZHANG, Q.; ZHANG, J.; ZEN, K.; ZHANG, C. Y. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian

LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. **Cell Res**, v. 22, n. 1, p. 107-26, Jan 2012.

ZHANG, T.; LIU, M.; WANG, C.; LIN, C.; SUN, Y.; JIN, D. Down-regulation of MiR-206 promotes proliferation and invasion of laryngeal cancer by regulating VEGF expression. **Anticancer Res**, v. 31, n. 11, p. 3859-63, Nov 2011.

ZHAO, Y.; SAMAL, E.; SRIVASTAVA, D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. **Nature**, v. 436, n. 7048, p. 214-220, 2005.

ZHOU, H.; CHERUVANKY, A.; HU, X.; MATSUMOTO, T.; HIRAMATSU, N.; CHO, M. E.; BERGER, A.; LEELAHAVANICHKUL, A.; DOI, K.; CHAWLA, L. S.; ILLEI, G. G.; KOPP, J. B.; BALOW, J. E.; AUSTIN, H. A., 3RD; YUEN, P. S.; STAR, R. A. Urinary exosomal transcription factors, a new class of biomarkers for renal disease. **Kidney international**, v. 74, n. 5, p. 613-21, Sep 2008.

ZHOU, R.; LI, X.; HU, G.; GONG, A. Y.; DRESCHER, K. M.; CHEN, X. M. miR-16 targets transcriptional corepressor SMRT and modulates NF-kappaB-regulated transactivation of interleukin-8 gene. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30772, 2012.